

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
2. Oktober 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/080122 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 48/00**
- (74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Leitzstrasse 45, 70469 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP03/02969**
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
21. März 2003 (21.03.2003)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 13 780.3 22. März 2002 (22.03.2002) **DE**
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **ORTHOGEN AG** [DE/DE]; Graf Adolf Strasse 43, 40210 Düsseldorf (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **MEIJER, Hans** [NL/DE]; Metzer Strasse 24, 50677 Köln (DE). **REI-NECKE, Julio** [DE/DE]; Guntherstrasse 162, 50739 Köln (DE). **WEHLING, Peter** [DE/DE]; Pigageallee 2a, 40597 Düsseldorf (DE).
- Veröffentlicht:**  
— *mit internationalem Recherchenbericht*
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*



**WO 03/080122 A1**

(54) Title: METHOD AND AGENT FOR PRODUCING THERAPEUTICALLY ACTIVE BLOOD COMPOSITIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MITTEL ZUR HERSTELLUNG THERAPEUTISCH WIRKSAMER BLUTZUSAMMENSETZUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing induced blood compositions from blood, whereby the blood cells, in a transient or stable manner, express and optionally secrete one or more therapeutically and/or diagnostically significant proteins and/or effector molecules.

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung induzierter Blutzusammensetzungen aus Blut, wobei die Blutzellen transient oder stabil ein oder mehrere therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Protein und/oder Effektormoleküle exprimieren und gegebenenfalls sezernieren.

## **Verfahren und Mittel zur Herstellung therapeutisch wirksamer Blutzusammensetzungen**

### **Beschreibung**

- 5 Die Erfindung betrifft im Wesentlichen Verfahren zur Herstellung induzierter Blutzusammensetzungen aus Blut, wobei die Blutzellen transient oder stabil ein oder mehrere therapeutisch oder diagnostisch bedeutsame Proteine und/oder Effektormoleküle exprimieren und gegebenenfalls sezernieren.
- 10 Die Produktion von eukaryontischen, rekombinanten Proteinen ist aufwendig und teuer. Die korrekte Prozessierung solcher Proteine ist ebenfalls problematisch. Die Stärke der therapeutischen Wirkung der Proteine ist stark abhängig von der Prozessierung dieser Proteine. Herkömmliche rekombinante Proteine zeigen eine mangelnde Wirk-
- 15 samkeit durch falsche Prozessierung, zum Beispiel das Fehlen der Glykosylierung. Die korrekte Prozessierung der rekombinanten Proteine erhöht die therapeutische Wirksamkeit um ein Vielfaches.

Es ist es sehr aufwendig, rekombinante Proteine ohne Verunreinigungen herzustellen. Der Grad der Reinheit spielt aber bei deren

20 Wirkung und bei der Vermeidung von Nebenwirkungen eine große Rolle. Auf herkömmliche Art und Weise hergestellte rekombinante Proteine können zu Unverträglichkeitsreaktionen führen, welche insbesondere durch die in den Proteinpräparationen enthaltenen Verunreinigungen selbst sowie durch mögliche Reaktionen des Organismus,

25 insbesondere Immunreaktionen, auf die Proteine und/oder die

Verunreinigungen zurückzuführen sind. Die Bereitstellung von rekombinanten Proteinen gewonnen aus, insbesondere autologen, Zellen des tierischen oder menschlichen Körpers, welche darüber hinaus leicht erhältlich sind, wird daher angestrebt.

- 5 Bisher ist die Transfektion verschiedener spezifischer Fraktionen von Blutzellen bekannt. Van Tendeloo *et al.*, (Gene Therapy (2000) 7:1431-1437) beschreiben Systeme für den Gentransfer in primäre menschliche Blutzellen mittels Elektroporation, wobei als Blutzellen aktivierte menschliche T-Lymphozyten und/oder adulte Knochen-
- 10 markszellen des Typs CD34<sup>+</sup> jeweils in ihrer kultivierten Form durch Elektroporation transfiziert werden. Jeweils vor der Transfektion werden die T-Lymphozyten durch die Anwendung von PHA oder durch CD3-„cross linking“ und durch Interleukin-2 vor der Transfektion aktiviert. Ebenso beschreiben Harrison *et al.* (BioTechniques (1995)
- 15 19:816-823) den Gentransfer mittels kationischer Lipide in Zelllinien oder in primäre menschliche Zellen, insbesondere mononucleäre Zellen des peripheren Blutes und/oder CD34<sup>+</sup>-angereicherte hämatopoetische Zellen.

- Alternative Methoden zur Transfektion von eukaryontischen Zellen, beispielsweise durch primär mechanische Beanspruchung sind be-
- 20 schrieben. Costanzo und Fox (Genetics (1988) 120:667-670) beschreiben die Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA und kleinen Glaskugeln („glassbeads“) in YPD-Medium. Dabei werden die Glaskügelchen benutzt, um die Zellen mechanisch „aufzureiben“,
- 25 was das Eindringen der Plasmid-DNA in die Hefezellen erleichtert.

Ausgehend vom Stand der Technik besteht das der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende technische Problem in der Bereitstel-

lung von Verfahren und Mitteln zu deren Durchführung, die es gestatten, eukaryontische, therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine, insbesondere autologe Proteine, aus Blutzellen, insbesondere autologen Blutzellen, zu erhalten.

- 5 Das technische Problem wird im Wesentlichen durch eine transiente, genetische Transformation von Blutzellen, die bevorzugt direkt anschließende Kultivierung dieser Zellen im Serum und die bevorzugt anschließende Applikation des produzierten Proteins im Serum, insbesondere ohne Aufreinigung gelöst. Erfindungsgemäß wird das
- 10 Problem durch ein Verfahren zur Herstellung einer induzierten Blutzusammensetzung aus Blut gelöst, wobei im Blut, insbesondere im Vollblut, das heißt im nicht aufgereinigten und/oder fraktionierten Blut, enthaltende Blutzellen transient, das heißt für einen bestimmten Zeitabschnitt begrenzt, oder stabil, das heißt dauerhaft, mit mindestens
- 15 einem Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, transformiert werden. Erfindungsgemäß bevorzugt codiert das mindestens eine Nucleinsäuremolekül mindestens ein Genprodukt, vorzugsweise ein Protein, besonders bevorzugt ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein und/oder mindestens
- 20 ein Effektormolekül, beispielsweise ein Effektorprotein, oder vorzugsweise mindestens ein Nucleinsäuremolekül, insbesondere RNA, das die Serumkonzentration therapeutisch oder diagnostisch relevanter Proteine moduliert, vorzugsweise erhöht. In einem weiteren Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird so eine induzierte
- 25 Blutzusammensetzung erhalten, welche mindestens eine transformierte Blutzelle umfasst, welche das mindestens eine Genprodukt, insbesondere ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein und/oder Effektormolekül, transient oder stabil exprimiert und

dieses vorzugsweise gegebenenfalls freisetzt, das heißt sezerniert, und, insbesondere in einem weiteren Schritt, aus der induzierten Blutzusammensetzung das mindestens eine Genprodukt, vorzugsweise das therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Protein und/oder Effektormolekül und/oder mindestens ein Effektormolekül-reguliertes therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein erhalten wird.

Besonders vorteilhaft ist dabei, dass die Benutzung von Blut als Rohstoff auf der einen Seite und als Produktionssystem für das mindestens eine Genprodukt auf der anderen Seite vorzugsweise zusammen mit einer Applikation des mindestens einen bevorzugt produzierten Proteins insbesondere im Serum besonders einfach und kostengünstig ist. Es zeigt sich auch, dass die eukaryontischen Blutzellen die Proteine korrekt prozessieren. Darüber hinaus treten, besonders vorteilhaft, in dem erfindungsgemäßen, vorzugsweise autologen oder heterologen, Produktionssystem keine Verunreinigungen oder andere immunogene Komponenten auf, die zu Unverträglichkeitsreaktionen bei einem Empfänger des Genprodukts führen könnten. Bei der Benutzung eines erfindungsgemäß erhaltenen Effektormoleküls, das heißt eines Genprodukts, welches insbesondere die Serumkonzentration von therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen Proteinen moduliert, vorzugsweise erhöht, enthält die Blutzusammensetzung besonders vorteilhaft nur autologe, das heißt von dem Spender stammende, und therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine. Eine immunologische Reaktion bei Applikation, vorzugsweise Re-Applikation, der so hergestellten Blutzusammensetzung ist daher praktisch auszuschließen.

Wird für die erfindungsgemäße Transformation mindestens ein Effektormolekül, insbesondere Effektorprotein, codierendes Nucleinsäuremolekül oder Effektormolekül genutzt, welches die Produktion einer Vielzahl, vorzugsweise jeglicher, Proteine anregt, ergibt sich  
5 besonders vorteilhaft, dass die Produktion und/oder Freisetzung von gleichzeitig mehreren, vorzugsweise autologen, Proteinen in den Blutzellen angeregt wird. Insbesondere werden die Proteine dabei in einem natürlichen Mengenverhältnis zueinander produziert und/oder freigesetzt. Beispiele für solche Effektormoleküle sind Transkriptions-  
10 faktoren, Proteine, welche Teil der Signaltransduktionskette sind, extrazelluläre Signalmoleküle wie Cytokine oder anti-sense RNAs. Da viele Erkrankungen multifaktorielle Ursachen haben, ist die, insbesondere gleichzeitige, Produktion mehrerer therapeutisch wirksamer Proteine in einem individuellen, physiologischen Verhältnis der  
15 Proteine zueinander für die Anwendung dieser Proteine als Wirkstoffe, insbesondere in einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung des tierischen oder menschlichen Körpers, besonders vorteilhaft.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist die erfindungsgemäß induzierte Blutzusammensetzung  
20 mindestens ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein in höherer Konzentration als eine nicht transformierte Blutzusammensetzung auf. Erfindungsgemäß bevorzugt sind therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine wie Cytokine, wie der  
25 natürliche oder abgewandelte Interleukin-1 Rezeptorantagonist, IL-1Ra, (IRAP).

Erfindungsgemäß bevorzugt wird in mindestens einer Blutzelle der erfindungsgemäß induzierten Blutzusammensetzung mindestens ein Effektormolekül, insbesondere Effektorprotein, exprimiert, welches in nicht transformierten Blutzellen überhaupt nicht oder in einer Menge  
5 exprimiert wird, die unter derjenigen Menge liegt, welche von der mindestens einen, das Effektormolekül, insbesondere Effektorprotein, exprimierenden Blutzelle der erfindungsgemäß induzierten Blutzusammensetzung produziert wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Blut zur Herstellung der induzierten Blutzusammensetzung einem Organismus, insbesondere einem menschlichen oder tierischen Körper, Patienten oder Probanden mit mindestens einem Entnahmesystem, vorzugsweise einer Spritze, entnommen. Erfindungsgemäß bevorzugt wird das Blut mit dem  
15 mindestens einen Nucleinsäuremolekül innerhalb der Spritze transformiert, wobei die zu transformierenden Blutzellen vorher nicht von anderen Blutkomponenten des entnommenen Bluts abgetrennt, das heißt fraktioniert, werden. In einer Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Blut mit mindestens einem Entnahmesystem,  
20 vorzugsweise mit einer Spritze, entnommen und anschließend in mindestens ein weiteres Gefäß gefüllt. Erfindungsgemäß bevorzugt wird das entnommene Blut in diesem mindestens einen weiteren Gefäß transformiert, vorzugsweise ohne vorher die zu transformierenden Blutzellen von anderen Blutkomponenten abzutrennen, das  
25 heißt als nicht fraktioniertes Blut, insbesondere als Vollblut. In einer Variante werden aus dem entnommenen Blut Blutzellen, insbesondere nucleäre Zellen wie mononucleäre Zellen, PBMC, von anderen Blutkomponenten getrennt, die Blutzellen transformiert und in Medi-

um mit oder ohne Serum, insbesondere autologem Serum, vorzugsweise autologem Serum, das bei oben genannter Trennung, das heißt Fraktionierung, als isolierte Blutkomponente erhalten wurde, oder in reinem, das heißt unverdünntes, Serum, insbesondere reinem, autologem Serum, vorzugsweise reinem, autologem Serum, das bei oben genannter Trennung als isolierte Blutkomponente erhalten wurde, inkubiert.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist das mindestens eine zu transformierende Nucleinsäuremolekül in einem Vektor enthalten, zum Beispiel in einem Plasmid oder in einem Virus.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist das mindestens eine zu transformierende Nucleinsäuremolekül funktionell verbunden zu mindestens einem regulatorischen Element, zum Beispiel einem Promotor, Enhancer oder Intron, insbesondere mindestens einem blutzellspezifischen regulatorischen Element. In einer Variante ist das mindestens eine zu transformierende Nucleinsäuremolekül funktionell verbunden zu mindestens einem ein Signalpeptid für die Proteinsekreterung aus der Zelle codierenden Nucleotidabschnitt.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird das zu transformierende Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, gegebenenfalls mit mindestens einer Markersubstanz markiert. In einer Variante wird diese Markersubstanz genutzt zur Entfernung von überschüssiger, das heißt nicht transformierter, DNA nach Abschluss des Transformationsvorgangs.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird das zu transformierende Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, zusammen mit mindes-



tens einem weiteren Stoff, welcher die Transfektionsrate und/oder die Expressionsrate des zu transformierenden Nucleinsäuremoleküls moduliert, vorzugsweise erhöht, transformiert. Erfindungsgemäß bevorzugt erfüllt der weitere Stoff mindestens eine der folgend genannten Funktionen: a) Erkennung der Oberflächen spezifischer Zelltypen, um so diese Zellen spezifisch zu transformieren, b) Erhöhung der Aufnahmeeffizienz des zu transformierenden Nucleinsäuremoleküls in die Zelle, c) Optimierung des nucleären Transports des zu transformierenden Nucleinsäuremoleküls, d) Erhöhung der Transkriptionseffizienz des Transgens in der transformierten Zelle.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das mindestens eine zu transformierende Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, immobilisiert auf mindestens einem festen Träger, insbesondere großen oder kleinen Kugeln, beispielsweise aus Glas, auf magnetischen Kügelchen und/oder auf der Wand des Gefäßes, worin die Transformation stattfindet, insbesondere der Spritze, zur Transformation verwendet wird.

Die Transfektion mit Kugeln, vorzugsweise Mikrogaskügelchen, („Bead-Transfektion“) stellt ein System dar, bei dem Kugeln, vorzugsweise Glaskugeln, mit Nucleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit Plasmid-DNA, beschichtet („gecoated“) werden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Mikrogaskügelchen“ oder „Glaskugeln“ nicht allein Glaskugeln aus dem Material Glas verstanden, sondern auch Kugeln aus weiteren Materialien, welche bezüglich ihrer Funktion mit Glas vergleichbar sind, insbesondere Nucleinsäuremoleküle kovalent und/oder non-kovalent bin-

den können, beispielsweise polymere Kunststoffe wie Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol, Polytetrafluorethylen, Polyacrylate, Polyamide, Polycarbonate, Polyimide, Polyacetate, Polyolefine, Silikone, Polysilane, Latex und ähnliche und/oder Gemische daraus. Die Kugeln sind erfindungsgemäß bevorzugt auch als magnetische Kugeln („magnetic beads“) ausgebildet. Die Größe der Kugeln beziehungsweise Granulatpartikel liegt vorzugsweise zwischen 2 und 4 mm Durchmesser, wobei jedoch auch kleinere Partikel, insbesondere größer als 100 µm, eingesetzt werden können, zum Beispiel Glas-

5 mehl.

10

Während der Adhärenz der Zellen an diese Kugeln werden Nucleinsäuremoleküle, insbesondere DNA oder RNA, vorzugsweise Plasmid-DNA, in die Zellen aufgenommen, gelangen in den Zellkern und werden dort exprimiert. Erfindungsgemäß ist vorgesehen, Nucleinsäuremoleküle auf einem festen Träger, zum Beispiel auf den großen oder kleinen Glaskugeln und/oder auf der Oberfläche des Entnahmesystems, vorzugsweise in Form einer Spritze, und/oder auf weiteren Gefäßen, die mit entnommenen Blut oder aufgetrennten Blutfraktionen in Kontakt gebracht werden, aufzubringen. Kernhaltige

15

20

Blutzellen aus dem entnommenen Blut adherieren spezifisch an diesem Träger, wie bei größeren Kugeln, und/oder phagozytieren diesen Träger, wie bei kleineren Kugeln.

Die Beschichtung der Kugeln mit den Nucleinsäuremolekülen erfolgt bevorzugt in kovalenter oder aber in non-kovalenter Art und Weise.

25

Eine kovalente, insbesondere eine säure-labile kovalente, Bindung ist vor allem effektiv wenn die Träger durch Phagozytose aufge-

nommen werden. Eine non-kovalente Bindung ist vor allem effektiv, wenn die DNA nach Adhärenz aufgenommen wird.

Als Alternative und/oder zusätzliche Transformationsmethode ist die Elektroporation vorgesehen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird daher das mindestens eine zu transformierende Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, durch Elektroporation der zu transformierenden Blutzellen transformiert. In einer bevorzugten Ausführungsform beinhaltet das zu transformierende Nucleinsäuremolekül mindestens ein die Expression körpereigener Proteine induzierendes, reprimierendes und/oder regulierendes Nucleinsäuremolekül, beispielsweise mindestens ein Antisensekonstrukt, RNA-Element, transposables Element, Transkriptionsfaktor, insbesondere besteht es daraus.

Bei der Applikation spezifischer elektrischer Felder werden Zellen in Abhängigkeit von den gewählten elektrischen Parameter ab einer bestimmten Größe transfiziert. Es ist vorgesehen, mit Hilfe der Elektroporation insbesondere kernhaltige Blutzellen zu transformieren; dies geschieht insbesondere ohne eine vorherige Aufreinigung der kernhaltigen Blutzellen aus dem Blut. Das heißt, besonders vorteilhaft werden im Vollblut kernhaltige Blutzellen transformiert. Es ist vorgesehen, während der Elektroporation bevorzugt „nackte“ DNA zu benutzen, welche gegebenenfalls markiert ist, beispielsweise mit Biotin, um überschüssige, das heißt nicht transformierte, DNA nach Abschluss des Transformationsvorgangs wieder entfernen zu können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird nach erfolgter Transformation, der Ex-

pression des mindestens einen transgenen Genprodukts, insbesondere des therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen Proteins und/oder Effektors in der mindestens einen transgenen Blutzelle und der Sezernierung aus der Blutzelle in das Serum, die mindestens  
5 eine Blutzelle und gegebenenfalls mindestens eine weitere nicht transformierte Blutzelle aus der induzierten Blutzusammensetzung vom Serum abgetrennt und ein induziertes, vorzugsweise zellfreies, Serum erhalten.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt wird das zu transformieren-  
10 de Nucleinsäuremolekül mit Hilfe von Liposomen, viralen Vektoren oder gebunden an großen und/oder kleinen Kugeln, insbesondere Mikrogaskügelchen, transformiert, wobei insbesondere gegebenenfalls das mindestens eine zu transformierende Nucleinsäuremolekül säurelabil an die großen und/oder kleinen Kugeln gebunden ist.

15 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem auch ein Verfahren zur Transformation von mindestens einer, insbesondere im Blut vorhandenen, Zelle, beispielsweise Blutzellen, mit mindestens einem Nucleinsäuremolekül, wobei die Zelle und/oder Blutzellen mit den Nucleinsäuremolekülen in Kontakt gebracht, die Zellen  
20 und/oder die im Blut vorhandenen Blutzellen transformiert und stabil oder transient transformierte Zellen und/oder Blutzellen erhalten werden. Erfindungsgemäß bevorzugt werden dabei die zu transformierenden Nucleinsäuremoleküle vor der Transformation insbesondere kovalent, insbesondere säurelabil, an große und/oder kleine  
25 Kugeln, insbesondere Mikrogaskügelchen, gebunden.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, wobei dem

menschlichen oder tierischen Körper Blut, vorzugsweise mittels mindestens einer Spritze, entnommen wird und ein vorgenanntes erfindungsgemäßes Verfahren durchgeführt wird, um insbesondere eine induzierte Blutzusammensetzung herzustellen. Erfindungsgemäß  
5 wird die induzierte Blutzusammensetzung dem, vorzugsweise demselben, menschlichen oder tierischen Körper, wieder appliziert, vorzugsweise reappliziert. Bevorzugt wird im Wesentlichen allein das induzierte Blutserum, insbesondere nach Abtrennung der Blutzellen und/oder anderen Blutkomponenten, insbesondere korpuskulären  
10 Komponenten wie Erythrozyten und/oder Fibrinogen, in den menschlichen oder tierischen Körper appliziert. In einer erfindungsgemäßen Variante dieses Verfahrens wird die hergestellte induzierte Blutzusammensetzung oder das induzierte Blutserum nicht in denselben tierischen oder menschlichen Körper reappliziert, sondern vielmehr  
15 in einen anderen tierischen oder menschlichen Körper appliziert.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist die Verwendung von großen und/oder kleinen Kugeln wie Mikrogaskugeln, woran, vorzugsweise kovalent, vorzugsweise säurelabil, Nucleinsäuremoleküle gebunden sind, für die Transformation von Blut, vorzugsweise  
20 von nucleären Zellen aus Blut, insbesondere im Vollblut. Erfindungsgemäß bevorzugt ist dabei die Verwendung für die Expression und Sezernierung von Proteinen und/oder Effektoren im Blut, insbesondere in Blutzellen. Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist daher auch die Verwendung für die Transformation von biologischen  
25 Zellen, insbesondere eukaryontischen Zellen, besonders bevorzugt pflanzlichen, pilzlichen oder tierischen Zellen wie Säugerzellen, insbesondere humanen Zellen.

Weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist schließlich die Verwendung von Blut, insbesondere Vollblut, für die Transformation von Nucleinsäuremolekülen codierend wenigstens ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein und/oder Effektormolekül, in mindestens eine Blutzelle des Blutes, insbesondere Vollblutes, für therapeutische, insbesondere gentherapeutische Zwecke, vorzugsweise für die Gentherapie und/oder die Behandlung von Leukämie, die Behandlung von traumatischen, degenerativen, chronisch inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems, des Bewegungsapparates oder verschiedener innerer Organe. Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist daher auch die Verwendung von Blut, insbesondere Vollblut, für die Herstellung von Arzneimittelkits, insbesondere aus einer erfindungsgemäß hergestellten induzierten Blutzusammensetzung und/oder induziertem Serum, für die vorgenannten therapeutischen Zwecke. Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist auch die Verwendung von Nucleotidmolekülen, insbesondere codierend für mindestens ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein und/oder Effektormolekül, für die Transformation von Blut, insbesondere von mindestens einer in dem Blut enthaltenen Blutzelle, und die Expression und gegebenenfalls Sezernierung mindestens eines therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen Proteins und/oder Effektormoleküls für die vorgenannten therapeutischen Zwecke. Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist auch die Verwendung dieser Nucleotidmoleküle, insbesondere codierend für therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine und/oder Effektormoleküle, für die Herstellung eines Arzneimittelkits für diese Transformation.

Erfindungsgemäß bevorzugt findet die pharmazeutische Produktion des mindestens einen, insbesondere therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen, vorzugsweise autologen Proteins, durch patienteneigene Blutzellen und die anschließende autologe therapeutische Applikation statt. Alternativ dazu ist eine Transformation und Inkubation der Blutzellen direkt nach der Entnahme des Vollbluts in einem Entnahmesystem, die Aufarbeitung und Applikation des Serums vorgesehen. Insbesondere wenn die Transformation nach Auftrennung von Blutkomponenten beziehungsweise die Aufreinigung von mononukleären peripheren Blutzellen, PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“).

stattfindet, wird die Transformation bevorzugt durchgeführt a) ohne Wachstumsinduzierung mit zum Beispiel mitogenen oder wachstumsstimulierenden Substanzen wie Interleukin-2 (IL-2) oder b) mit Wachstumsinduzierung mit zum Beispiel mitogenen oder wachstumsstimulierenden Substanzen wie IL-2.

Nach der Wachstumsinduzierung und der Transformation bevorzugt mit Hilfe von Liposomen oder mittels Elektroporation ist vorgesehen, dass die Zellen ohne oder mit weiterer Wachstumsinduzierung weitergezüchtet werden. Es zeigt sich, dass insbesondere die Benutzung von elektrischen Feldern, insbesondere bei der Elektroporation, das Zellwachstum und/oder die Zellentwicklung stimuliert. Die Elektrostimulation ist daher auch als Alternative zu bekannten wachstumsstimulierenden Substanzen vorgesehen.

Für die Entfernung der nicht transformierten Nucleinsäuremoleküle, insbesondere DNA und RNA, nach erfolgter Transformation, insbesondere die Entfernung der DNA aus humanem Serum nach Inkuba-

tion sind erfindungsgemäß im Wesentlichen folgende Verfahren vorgesehen: In einer bevorzugten Variante sind die zu transformierenden Nucleinsäuremoleküle gekoppelt an einen Träger, wobei nach der Inkubation das Serum zentrifugiert wird, und nach der Zentrifuga-

5 tion das Serum, welches die gewünschten Proteine enthält, entnommen und filtriert wird, um die letzten Träger- und Zellreste zu entfernen, wobei die nicht transformierten Nucleinsäuremoleküle zusammen mit den Trägern entfernt werden. In einer weiteren Variante werden markierte Nucleinsäuremoleküle eingesetzt, wobei nach der

10 Inkubation dem Serum Zusatzstoffe, insbesondere Träger, hinzugefügt werden, welche eine Affinität für die markierten Nucleinsäuremoleküle besitzen. Im Falle von erfindungsgemäß bevorzugt mit Biotin markierten Nucleinsäuremolekülen werden mit Streptavidin beschichtete Träger eingesetzt, welche die Biotin-markierten Moleküle

15 binden. Die Träger werden anschließend mittels Zentrifugation und/oder, im Falle von magnetischen Trägern, mittels Magnetismus aus dem Serum entfernt, wobei die nicht transformierten Nucleinsäuremoleküle an den Träger gebunden aus dem Serum entfernt werden. In einer weiteren Variante wird das Serum mit den darin enthal-

20 tenen nicht transformierten Nucleinsäuremolekülen mittels mindestens einem Filter, welcher eine Affinität für die Nucleinsäuremoleküle hat, gereinigt. Beispielsweise binden mit Biotin markierte Nucleinsäuremoleküle an einen mit Streptavidin beschichteten Filter. Besonders vorteilhaft werden in dieser Variante in einem einzigen Schritt sowohl

25 Zellreste als auch überschüssige, nicht transformierte Nucleinsäuremoleküle aus dem Serum entfernt.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele und Figuren näher beschrieben.



Die Figuren zeigen:

Figur 1 – die Darstellung des IL-1 $\beta$ -Gehalts in der Blutzellkultur nach dem Pyrogenitätstest des Plasmids *pcDNA-IL-1Ra*,

5    Figur 2 – die Darstellung der Abhängigkeit der DNA-Bindung an Glaskugeln von dem pH-Wert des Puffers,

Figur 3 – die Darstellung der Abhängigkeit der DNA-Bindung an Glaskugeln von der Inkubationszeit in DNA-haltigem Puffer,

10    Figur 4 – ein Agarose-Gel (2%) nach der PCR auf eine Verdünnungsreihe von *pcDNA-IL-1Ra* in TE und auf Kugelwaschwasser, Ethidiumbromid-Färbung. Die Pfeile zeigen die vergleichbaren Verdünnungsstufen,

15    Figur 5 – ein Agarose-Gel (2%) nach der PCR auf eine Verdünnungsreihe von *pcDNA-IL-1Ra* in Humanserum, Ethidiumbromid-Färbung, die Kontrolle enthält keine „Template“-DNA („Wasserkontrolle“),

Figur 6 – ein Agarose-Gel (2%) nach einer „nested“-PCR auf eine Verdünnungsreihe von *pcDNA IL-1Ra* in Humanserum, Ethidiumbromid-Färbung, die Kontrolle enthält keine „Template“-DNA („Wasserkontrolle“),

20    Figur 7 – ein Agarose-Gel (2%) nach PCR auf Verdünnungsreihe von *pcDNA-IL-1Ra* in Humanserum, Probenmaterial des erfindungsgemäßen Spritzensystems mit „Bead Transfektion“ und des ORTHOKIN®-Systems, Färbung mittels Ethidiumbromid,

Figur 8 – eine Darstellung des IL-1Ra-Gehalts nach „Bead-Transfektion“ in der Blutzellkultur,

Figur 9 – eine Darstellung des IL-1Ra-Gehalts im Serumüberstand nach 24 Stunden Inkubation von Vollblut, Vergleich des erfindungsgemäßen Spritzensystems mit „Bead Transfektion“ mit den  
5 ORTHOKIN®-System, einer Perfusorspritze ohne Kugeln und mit der Nullprobe,

Figur 10 – eine Darstellung der spezifischen Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase nach Elektroporation von PBMCs mit *pVaxLacZ*,

10 Figur 11 – eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäß eingesetzten Spritze (1) aus Glas oder Kunststoff mit einem Stempel (3), einem optional abschraubbaren Verschluss (5), einem Verschlussansatz (13) und einer darauf angeordneten und diesen abschließenden abnehmbaren Kappe (7) mit Septum. Der Stempel (3)  
15 weist bevorzugt eine Sollbruchstelle (15) auf. Dargestellt ist auch erfindungsgemäß beschichtetes Granulat (9) im Lumen der Spritze.

Beispiel 1: Transformation einer Blutzellkultur mit Hilfe von DNA-beschichteten Mikrogaskügelchen („Bead-Transfektion“).

#### a) Blutzellkultur

20 Die Blutzellkultur ist ein System, das hauptsächlich in der Forschung und der Entwicklung eingesetzt wird. Die Blutzellkultur dient der Kultivierung von Vollblut. Diese Methode wird zur „Bead-Transfektion“ und zum Toxizitätstest von DNA genutzt.

Dazu wird eine 48-Well-Zellkulturplatte (Nunc, Wiesbaden) entsprechend dem Versuchsansatz vorbereitet, indem Mikroglaskügelchen zur „Bead-Transfektion“ beziehungsweise DNA für einen Toxizitätstest eingebracht werden. Anschließend wird nicht koaguliertes Vollblut 5 in die Kavitäten gegeben, wobei bei einer 48-Well-Platte circa 1 ml pro Kavität eingesetzt werden. Ein Teil des Vollbluts wird als Null-Probe für etwa 5 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert, anschließend wird der Überstand abgenommen und in eine Kavität einer 96-Well-Platte gegeben. Die Platte mit der Null-Probe wird 10 verschlossen und eingefroren bei -80°C gelagert. Die 48-Well-Zellkulturplatte wird ebenfalls verschlossen und etwa 24 Stunden bei etwa 37°C bei 5% CO<sub>2</sub>-Sättigung und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wird der Serum-Überstand der Proben in der 48-Well-Zellkulturplatte abgenommen und ebenfalls in die 96-Well-Platte gegeben. Die 96-Well-Platte mit den Proben wird bis zur 15 Analyse eingefroren bei -80°C aufbewahrt.

Bei einem Toxizitätstest beziehungsweise Pyrogenitätstest wird der Interleukin-1 $\beta$ -Gehalt bestimmt; bei den Transfektionsexperimenten wird der Gehalt eines exprimierten Reporter- oder Zielproteins be- 20 stimmt.

Bei Ansätzen in anderen Formaten werden die Volumina jeweils entsprechend angepasst.

#### b) Produktion der Plasmid-DNA *pcDNA-IL-1Ra*

Das Plasmid *pcDNA-IL-1Ra* enthält mindestens eine Sequenz die für 25 eine Protein codiert („coding region“) sowie ein Steuer-Einheit („promoter“), die in eukaryontischen Zellen wirksam ist. Es besteht aus

der kodierenden Region, der IL-1Ra-cDNA, in einem pcDNA-1 Vektor (Firma Invitrogen, Karlsruhe). Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakteriensuspensionen erfolgt mit einem handelsüblichen System (Qiagen Maxiprep™ endofree-Kit™, Firma Qiagen) nach Protokoll des Herstellers. Alle vom Hersteller vorgeschlagenen Kontrollen werden durchgeführt. Die Qualitätskontrolle des isolierten Plasmids erfolgt in an sich bekannter Weise durch spezifische PCR, Restriktionsverdau und Toxizitätstest beziehungsweise Pyrogenitätstest in einer Blutzellkultur.

10 c) Pyrogenitätstest der Plasmid-DNA **pcDNA-IL-1Ra**

Es ist es erforderlich, dass die verwendete DNA nicht pyrogen ist. In einer Blutzellkultur (siehe a) mit pyrogener DNA lag der IL-1β-Gehalt bei durchschnittlich 2500 pg/ml. Als nicht pyrogen oder als endotoxinfrei gilt die DNA, wenn der IL-1β-Gehalt nach der Inkubation mit dem potentiellen Pyrogen den Gehalt des untersten Standards des IL-1β-ELISA-Tests, nämlich 15,2 pg/ml, nicht übersteigt. In Figur 1 sind die Ergebnisse des Pyrogenitätstests dargestellt:

Es kann keine Erhöhung des IL-1β-Gehalts bei Inkubation mit *pcDNA-IL-1Ra* detektiert werden. Die IL-1β-Konzentrationen des Serumüberstands der in der Blutzellkultur inkubierten Verdünnungsreihe der *pcDNA-IL-1Ra* sind kleiner als 15,2 pg/ml, die DNA wirkt nicht pyrogen.

d) Beschichtung der Glaskugeln

Plasmid-DNA wird unter spezifischen pH- und Salzbedingungen an die Oberfläche von Glaskugeln gebunden. Nicht alle Glasarten und -qualitäten können non-kovalent DNA binden. In folgender Weise

wird festgestellt, ob die Träger geeignet sind, DNA non-kovalent zu binden:

Erstens wird festgestellt, wie viele Waschschritte benötigt werden, um alle Rückstände wie Glasstaub und Schmutz von den zu beschichtenden Kugeln zu entfernen. Als Kugeln werden normalerweise Glaskugeln der Firma Roth (Karlsruhe) mit den folgenden Eigenschaften eingesetzt:

	Größe	2,85 bis 3,3 mm,
	Chem. Zusammensetzung:	
10	SiO <sub>2</sub>	68%,
	CaO	3%,
	BaO	6%,
	K <sub>2</sub> O	8%,
	Na <sub>2</sub> O	10%,
15	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1%,
	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2%,
	bleifrei.	

Dazu werden die Kugeln mehrmals hintereinander gewaschen, indem sie in ein 50 ml-Röhrchen gefüllt werden und dieses mit Phosphatpuffer mit pH 5,5 (1/15 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>, 1/15 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) aufgefüllt wird. Durch mehrmaliges Invertieren werden die Kugeln gewaschen; die Flüssigkeit wird anschließend wieder abgegossen.

Es ist vorteilhaft, zunächst bei extrem niedrigen pH, d.h. zwischen 0,01 und 2, oder bei extrem hohen pH, d.h. zwischen 10 und 14, vorzuwaschen, beziehungsweise erst bei hohem pH und anschließend bei niedrigem pH, oder erst bei niedrigem pH und anschließend bei hohem pH, um einen erhöhten Reinigungsgrad der Glas-

- träger zu erreichen. Die Waschzeiten betragen pro Waschdurchgang zwischen 2 min und 1 Std., vorzugsweise 30 min. Die Behandlungszeiten mit Säure und/oder Lauge betragen zwischen 2 min und 1 Std., vorzugsweise 30 min. Gleichzeitig kommt es bei dieser Säure-  
5 beziehungsweise Laugenbehandlung zu einer Modifizierung der Glasoberfläche. Diese Vorbehandlung oder Modifikation geschieht durch die Anwendung von herkömmlichen organischen und/oder anorganischen Säuren wie Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, Phosphorsäure Zitronensäure oder Essigsäure, etc. sowie bevor-  
10 zugs Chromschwefelsäure, vorzugsweise 50%ige Chromschwefelsäure (z.B. Merck, Darmstadt, Best. Nr. 1.02499.2500, Chromschwefelsäure wird mit Biochrom Reinstwasser Ultra Pure Water No. L 0040 bis zur gewünschten Verdünnung verdünnt), beziehungsweise Laugen wie Natronlauge, Kalilauge, Ammoniak, etc.
- 15 Der Verschmutzungsgrad wird durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer oder mehreren Wellenlängen zwischen 200 und 800, vorzugsweise bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) ermittelt.
- Üblicherweise bleibt nach 4 Waschschritten die  $OD_{280}$  konstant (siehe Tabelle 1), was zeigt, dass entfernbare Schmutzpartikel von den  
20 Glaskugeln entfernt sind.
- Optional werden die Kugeln zusätzlich solange mit reinem Wasser, Leitfähigkeit bis maximal etwa 1  $\mu$ S, gewaschen, bis die Leitfähigkeit des Waschwassers wieder der ursprünglichen Leitfähigkeit entspricht. Dann wird der Waschschriff noch einmal wiederholt. Dieser  
25 Schritt entfernt eventuelle Reste von Ionen, die die Bindung der DNA und einen klinischen Einsatz nachteilig beeinflussen können.

Als Bindungspuffer wird idealerweise eine physiologische Lösung wie PBS eingesetzt, weil dann für einen zellphysiologischen oder klinischen Einsatz die Ionenstärke und Zusammensetzung des Puffers nicht angepasst werden soll. Es wird ein pH-Wert-Gradient mit

5 PBS im pH-Wert-Bereich von 5 bis 7 erstellt und die Bindung der DNA an den Glaskugeln getestet. Hierzu werden die Kugeln zwischen 1 und 10 mal, bevorzugt 4 mal, mit dem jeweiligen Puffer gewaschen und mit *pcDNA-IL-1Ra* (10 µg/ml PBS) 90 min inkubiert. Vor und nach den einzelnen Schritten wird mittels OD-Messung bei

10 260 und 280 nm die Reinheit der Kugeln und die Bindung der DNA kontrolliert.

Tabelle 1 zeigt typische Ergebnisse einer OD-Messung nach 4 Waschschritten zur Entfernung von Schmutzpartikel von den Glaskugeln.

Tabelle 1:

pH	OD <sub>280</sub>			
	Waschdurchgang			
	1	2	3	4
5	1,3	0,7	0,3	0
5	1,1	0,7	0,2	0
5	1,0	0,8	0,2	0
5,5	0,8	0,6	0,3	0
5,5	0,9	0,7	0,3	0
5,5	1,1	0,6	0,3	0
6	1,0	0,6	0,4	0
6	1,1	0,6	0,4	0
6	0,9	0,6	0,4	0

Für die Untersuchung der DNA-Beschichtung der Kugeln werden die Kugeln 4-fach mit PBS (pH-Wert wie in der Tabelle angegeben) gewaschen, um die Kugeln mit den Ionen aus dem Puffer zu sättigen, und dann mit DNA-haltigem Puffer für unterschiedliche Zeitspannen inkubiert (30, 60, 90, 120, 150 und 180 min). Vor und nach den einzelnen Schritten wird mittels OD-Messung bei 260 und 280 nm kontrolliert, zuerst, ob alle Staubpartikel entfernt worden sind, und dann, wieviel DNA haften bleibt. Der pH-Wert des Puffers, bei dem die größte Menge DNA an den Kugeln bindet, beträgt pH 5,5 (siehe Figur 2). Die Inkubationszeit, bei der die größte Menge an DNA haften bleibt, beträgt 1,5 Stunden (siehe Figur 3).

Tabelle 2 zeigt Ergebnisse der OD-Messung zur Überprüfung der Waschschrirte und Bestimmung des DNA-Gehalts in Proben aus der Kugelbeschichtung.



Tabelle 2:

	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	DNA-Gehalt [µg/ml]
Waschwasser 1	0,016	0,012	1,26	0,8
Waschwasser 2	0,011	0,007	1,66	0,6
Waschwasser 3	0,011	0,006	1,86	0,5
Waschwasser 4	0,006	0,005	1,22	0,0
pcDNA vor Inkubation	0,112	0,078	1,43	15,6
pcDNA nach Inkubation	0,086	0,047	1,84	14,3
Waschwasser 5	0,0	0,0	0,0	0,0

- Die Glaskugeln für die weiteren Studien werden in 50 ml sterilen Röhrchen bis 15 ml gefüllt (ca. 400 Kugeln) und 4 mal in PBS mit einem pH-Wert von 5,5 gewaschen, wobei während der einzelnen
- 5 Waschschr tte eine sorgfältige Durchmischung erfolgt. Das Waschwasser wird mittels OD-Messung bei 280 nm auf Schmutzpartikel kontrolliert. Dann wird Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 5,5 (1/15 mol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>, 1/15 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>) mit Plasmid-DNA versetzt (15 µg/ml) und 10 ml dieser Lösung auf die gewaschenen Kugeln
- 10 gegeben. Nach 1,5 Stunden Inkubation wird die DNA-Lösung entfernt und über OD-Messung die verbliebene DNA-Menge ermittelt. Die Kugeln werden wiederholt mit PBS (pH-Wert 5,5) gewaschen, um nicht gebundene DNA zu entfernen.

e) Sterilisation der Kugeln

- 15 Die Sterilisation soll die DNA und die Bindung nicht schädigen. Deswegen wird keine Dampfsterilisation (führt zu Denaturierung der DNA) oder Strahlung (induziert Mutationen in der DNA) eingesetzt.

Die Sterilisation der DNA beschichteten Kugeln erfolgt durch Zugabe von 40 ml 70% Ethanol unter der Sterilbank. Nach 24 Stunden Inkubation wird das Ethanol entfernt und die Kugeln 4 mal in PBS (Firma PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Ethanol und Waschwasser werden durch die photometrische Absorption bei 260 und 280 nm auf DNA-Moleküle überprüft.

f) Nachweis der DNA auf den Kugeln mittels PCR

Glaskugeln werden beschichtet und sterilisiert wie oben beschrieben. Um einen weiteren eindeutigen Nachweis für die Bindung der DNA an die Glaskugeln zu erbringen, wird eine sensitive PCR-Methode entwickelt. Dazu wird ein Primer mittels der DNASTAR™-Software entwickelt und die Reaktionsbedingungen der Primer (Annealingtemperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, Elongationszeit, etc.) optimiert.

Um die DNA von den beschichteten Kugeln zu lösen, wird eine präparierte und eine nicht präparierte Kugel in 200 µl TE auf 95°C erhitzt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wird mittels eines Vergleichs mit einer Verdünnungsreihe einer bekannten Konzentration von Plasmid-DNA untersucht, ob DNA auf den Kugeln zu ermitteln ist (siehe Figur 4). Die Färbung der Banden erfolgt mittels Ethidiumbromid. Durch Vergleich der Bandenstärken der PCR auf den Kugelüberstand mit den Bandenstärken der bekannten Plasmidkonzentration kann der Gehalt an *pcDNA-IL-1Ra* im Kugelüberstand bestimmt werden.

Bei den nicht präparierten Kugeln konnte keine DNA detektiert werden (nicht dargestellt), auf den beschichteten Kugeln ist DNA anwesend. Nach Detektion mittels PCR und Gelelektrophorese (siehe Fi-

gur 4) konnte berechnet werden, dass die DNA-Konzentration in dem Kugelüberstand mindestens 1 µg/ml beträgt. An jeder Kugel bleiben 0,2 µg DNA haften.

g) Transfektion der Zellen

- 5 Die Transfektion erfolgt in einer Blutzellkultur. Die mit DNA beschichteten Glaskugeln werden in eine 48-Well-Zellkulturplatte MTP (Firma Nunc, Wiesbaden) eingebracht und mit 1 ml heparinisiertem Vollblut bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 Stunden Inkubation werden der Gesamtproteingehalt und der Gehalt an Reporter- oder Ziel-Protein
- 10 im Serumüberstand analysiert.

h) Bestimmung der PCR-Detektionsgrenze von Plasmid-DNA in Human-Serum nach Transfektion

- Für die Anwendung der Methode in der klinischen Praxis muss sichergestellt sein, dass sich keine Plasmid-DNA im Serum befindet.
- 15 Dies wird mit Hilfe der PCR überprüft:

DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und dNTP's werden von der Firma Qiagen (Hilden) im „Supermix™“ erworben und eingesetzt. Die Primer werden von Invitrogen (Karlsruhe) erworben. Deren Konzentrationen werden auf 20 µmol/l mit destilliertem Wasser eingestellt.

- 20 Zur PCR-Amplifikation werden folgendes Primerpaar SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2 verwendet:

(SEQ ID NO: 1) GCGCTTGTCTGCTTTCTGTTCTC

(SEQ ID NO: 2) TGGAGTTCCGCGTTACATA

Die PCR-Amplifikation wird dabei durchgeführt bei 94°C Denaturierung (30 sec), 58°C Annealing (30 sec) und 72°C Elongation (45 sec) in 30 Zyklen. Die Überprüfung der Amplifizierung erfolgt mittels Agarose-Gelelektrophorese.

- 5 Um die Nachweisgrenze der Plasmid-DNA-Mengen zu bestimmen, wird humanes Serum 1:1 mit einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA versetzt. Die durch PCR detektierte minimale Plasmidkonzentration beträgt 10 ng/ml (siehe Figur 5). Durch PCR auf eine Verdünnungsreihe bekannter Plasmidkonzentration kann eine Sensitivität der PCR von 1 µg/ml ermittelt werden (siehe Bande 2 in Figur 5).
- 10

Um eine hohe Sensitivität zu erreichen, wird eine „nested“-PCR durchgeführt. Zur Durchführung der „nested“-PCR wird ein weiteres Primerpaar SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4 eingesetzt:

(SEQ ID NO: 3) GTCCTGCTTTCTGTTCTCGCTCAG

- 15 (SEQ ID NO: 4) AACTAGAGAACCCACTGCTTAC

Das Serum wird 1:1 mit einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA versetzt, um die Nachweisgrenze der PCR zu detektieren. Die detektierbare Endkonzentration von *pcDNA-IL-1Ra* in Humanserum beträgt 10 pg/ml (Figur 6).

- 20 i) Detektion von *pcDNA-IL-1Ra* in Humanserum nach Anwendung der beschichteten Kugeln

Humanes, nicht transfiziertes Serum wird mit einer Verdünnungsreihe von Plasmid-DNA *pcDNA-IL-1Ra* versetzt und mit humanem Serum nach der Transfektion in einer PCR verglichen. Anhand der Ver-

dünnungsreihe von pcDNA-IL-1Ra kann die Sensitivität der PCR bestätigt werden, sie liegt bei 10 pg/ml. Figur 7 zeigt die Analyse des humanen Serums nach der Transfektion mittels PCR. In dem humanen Serum nach der Transfektion können keine DNA-Mengen von 10 pg/ml oder mehr detektiert werden. Dies bedeutet, dass nach der Transfektion keine DNA im Serum hinterblieben ist.

k) Expression des Transgens

Die Zielzellen werden mit den zuvor beschichteten Kugeln 24 h inkubiert und anschließend einer IL-1Ra und IL-1 $\beta$ -Messung unterzogen.

Als Kontrolle dient:

1. Serumüberstand bei Versuchsbeginn
2. Serumüberstand nach Inkubation mit ebenso behandelten aber nicht beschichteten Kugeln
3. Serumüberstand nach Inkubation ohne Kugeln.

Nach Analyse der Proben kann eine Erhöhung des IL-1Ra-Gehalts bei den mit beschichteten Kugeln inkubierten Proben im Vergleich zu den mit nicht beschichteten Kugeln inkubierten Proben und ohne Kugeln inkubierte Proben detektiert werden (siehe Figur 8). Nach IL-1 $\beta$ -Messung konnte keine Erhöhung detektiert werden, die Messwerte lagen zwischen 8,32 und 11,51 pg/ml (nicht dargestellt). Dies zeigt, dass die IL-1Ra Produktion nicht durch eine pyrogene Reaktion verursacht wird und die Folge der transiente Transformation sein muss.

Beispiel 2: Transformation mit Hilfe von DNA-beschichteten Glass-beads in einer Spritze

a) Erstellung der Spritze

5 Steriles Granulat aus Glas wird eingesetzt, zum Beispiel Granulat der Firma Roth (Karlsruhe), Best. Nr. 17557.1, oder ein Granulat der nachfolgenden Typen:

1) Roth

Größe: 2,85 bis 3,3 mm

Chem. Zusammensetzung (%):

10	SiO <sub>2</sub>	68
	CaO	3
	BaO	6
	K <sub>2</sub> O	8
	Na <sub>2</sub> O	10
15	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1
	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2
	bleifrei	

2) SiLi 5506/89-6

20	Größe:	2,3 bis 2,5 mm
	Material:	Borosilikatglas
	Behandlung:	1. Schleifverfahren 2. Polierverfahren

Chem. Zusammensetzung (%):

25	SiO <sub>2</sub>	82
	Na <sub>2</sub> O	2
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2

	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	14	
	Spezifisches Gewicht (kg/dm <sup>3</sup> ):		223
	Härte nach Mohs:		7
	Linearer Ausdehnungskoeffizient (20-300°C):		325
5	Hydrolytische Klasse (DIN ISO 719):		1
	Säureklasse (DIN 12116):		1
	Laugenklasse (DIN ISO 695):		2
	Transformationstemperatur (°C):		530
10	<u>3) SiLi 5004/99-5</u>		
	Größe:	2,5 mm	
	Material:	Kalknatronglas	
	Behandlung:	Pressverfahren	
	Chem. Zusammensetzung (%):		
15	SiO <sub>2</sub>	67	
	Na <sub>2</sub> O	16	
	CaO	7	
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5	
	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3	
20	MgO	2	
	PbO	frei	
	Härte nach Mohs:		größer oder gleich 6
	<u>4) Worf</u>		
25	Größe:	2 bis zu 3,5 mm	
	Material:	Kalknatronglas	
	Behandlung:	poliert und thermisch verfestigt	
	Chem. Zusammensetzung (%):		
	SiO <sub>2</sub>	65	

	Na <sub>2</sub> O	16	
	CaO	7	
	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5	
	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3	
5	MgO	2	
	Bleigehalt:	frei	
	Dichte (g/dm <sup>3</sup> ):		2,54
	Härte nach Mohs:		6
	Hydrolytische Klasse:		3
10	Deformationstemperatur (°C):		530 +/- 10

#### 5) Duran

	Größe:	2 bis zu 3,5 mm	
	Material:	Borosilikatglas	
15	Behandlung:	1. Schleifverfahren 2. Polierverfahren	
	Chem. Zusammensetzung (%):		
	SiO <sub>2</sub>	81	
	Na <sub>2</sub> O, K <sub>2</sub> O	4	
20	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2	
	B <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	13	
	Dichte (g/dm <sup>3</sup> ):		2,23
	Linearer Ausdehnungskoeffizient (20-300°C):		3,25
	Hydrolytische Klasse (DIN ISO 719):		1
25	Säureklasse (DIN 12116):		1
	Laugenklasse (DIN ISO 695):		2
	Transformationstemperatur (°C):		525



Die Oberfläche des Granulats wird normalerweise mit Hilfe eines handelsüblichen Chromschwefelsäure-Präparats im Batch-Verfahren, wie in Beispiel 1 ausgeführt, modifiziert; es kann aber auch jede andere in Beispiel 1 aufgeführte Säure und/oder Lauge verwendet werden. Anschließend wird das Granulat mit Wasser gespült, um die Säure/Lauge-Reste wegzuwaschen. Dann wird das Granulat bei 121°C unter einem Druck von 2 bar mindestens 20 min inkubiert, um so das Granulat zu sterilisieren und mit Wasser zu sättigen. Das Granulat wird anschließend für 20 min bei 80°C getrocknet.

Erste Waschschrirte werden in sterilen 50 ml-Röhrchen durchgeföhrt. Dann werden ca. 150 Glaskugeln in eine Kunststoff-Perfusor-Spritze, beispielsweise Typ Nr. 00137 (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg), überföhrt und in der Spritze mit DNA beschichtet. Die DNA-Lösung wird abgelassen und die Kugeln gewaschen. Alle weiteren Schritte werden unter der Sterilbank durchgeföhrt. Zur Sterilisation wird 70% Ethanol eingefüllt, die Spritze verschlossen und ca. 24 Stunden inkubiert. Dann folgen die Waschschrirte mit PBS (PAA Laboratories, Cölbe), wobei PBS oben eingefüllt wird und wieder ablaufen gelassen wird. Angepasst an die GröÖe der Spritze werden etwa 1, 2, 4 oder 10 cm<sup>3</sup>, oder gegebenenfalls mehr oder weniger, der präparierten Kugeln in eine zweite sterile Spritze umgefüllt. Gegebenenfalls wird die Spritze neben dem sterilisierten und modifizierten Granulat mit einer hinreichenden Menge eines Anticoagulans wie Heparin (Liquemin™, Heparin-Natrium™ 2500 I.E.) oder Na-Citrat gefüllt. Diese Spritze wird verschlossen und eingeschweiÖt.

b) generelle Anwendung der Spritze

Der Anwender entnimmt das sterile Besteck aus der Verpackung und entnimmt dem Patienten Blut. Die Spritze verfügt an ihrer Öffnung in dem Verschlussansatz über ein Septum, welches zur Entnahme durch das Abnahmezubehör, also die Nadel des Adapters, durchstochen wird. Nach Abnahme des Adapters verschließt sich das Septum selbsttätig wieder. Nach Blutentnahme wird der Spritzenstempel an einer Sollbruchstelle abgebrochen. Die Figur 12 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform dieser Spritze.

10 Die Spritze mit Blut wird dann 24 Stunden bei etwa 37°C bis 41°C inkubiert. Die Inkubation erfolgt liegend. Bevorzugt kann das Blut umgefüllt und zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation wird das Plasma dann durch einen sterilen Vorsatzfilter, zum Beispiel 0,2 µm, abgenommen.

15 c) experimentelle Anwendung der Spritze zur klinischen Einsetzbarkeit

Mit der präparierten Spritze wird einem freiwilligen Spender Blut entnommen. Als Kontrolle werden eine ORTHOKIN®-Spritze (Firma ORTHOGEN, Düsseldorf), eine Perfusor-Spritze ohne Kugeln und ein 10 ml-Serum-Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) als Null-Probe abgenommen. Die Null-Probe wird unmittelbar nach der Abnahme bei 4000 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert und der Serumüberstand bei -20°C eingefroren und aufbewahrt. Die Spritzen werden bei 37 °C und 5%CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Nach Inkubation wird das Serum abgenommen und bei 4000 x g, 4°C, 10 min zentrifugiert, um alle Blutzellen zu entfernen. Der Überstand wird mit einer

20 ml-Spritze (Firma Sarstedt, Nümbrecht) aufgezogen, mit einem 0,2 µm-Filter (Minisart™, Firma Sartorius) steril filtriert und in 1,8 ml-Röhrchen abgefüllt. Das Serum wird bei -20°C eingefroren und zur Analyse aufbewahrt.

- 5 Um die klinische Einsetzbarkeit des Systems beurteilen zu können, wird das erhaltene Serum sorgfältig analysiert. Neben der in der Transfusionsmedizin üblichen Qualitätskontrolle des Blutprodukts wie das Screening auf HCV, HBV, HIV und Syphilis wird ein Sterilitätstest und eine Messung des Transgenaktivität durchgeführt. Es
- 10 muss sichergestellt sein, dass eine übliche Qualitätskontrolle durchführbar ist und nicht nachteilig beeinflusst wird.

Die Benutzung einer Spritze als Entnahmesystem lässt eine klinische Anwendung zu. Die in der Transfusionsmedizin üblichen Qualitätskontrollen des Blutprodukts wie das Screening auf HCV, HBV, HIV

15 und Syphilis ergeben ein gleiches Ergebnis in allen getesteten Systemen. Der Sterilitätstest zeigte, dass in allen Systemen nach Aufarbeitung des Serums keine Keime vorkamen.

Es kann eine Erhöhung des IL-1Ra-Gehalts im erfindungsgemäßen Ansatz im Vergleich zur Null-Probe und zur ORTHOKIN®-Spritze

20 (Vergleichsbeispiel) ermittelt werden (siehe Figur 9). Es kann hingegen keine Erhöhung des IL-1β-Gehalts detektiert werden, die Messwerte liegen zwischen 7,2 und 10,9 pg/ml (nicht dargestellt). Dies zeigt, dass die IL-1Ra Produktion nicht durch eine pyrogene Reaktion verursacht wird und die Folge der transiente Transformation sein

25 muss.

#### d) Klinischer Erfolg

An einem Patientenkollektiv werden 18 therapeutische Anwendungen mit den hier beschriebenen Systemen durchgeführt und klinisch bewertet. Es handelt sich um Patienten mit Knorpeldefekten am Knie  
5 beziehungsweise Sprunggelenk aufgrund degenerativer und entzündlicher Erkrankungen des Bewegungsapparates.

Die Beurteilung der Wirksamkeit und der Nebenwirkungen wird radiologisch dokumentiert und anhand von WOMAC-Score, VAS-Score und anamnestischer Daten beurteilt.

- 10 Bezüglich der Wirksamkeit kann bei allen untersuchten und behandelten Patienten in den behandelten Gelenken im Beobachtungszeitraum eines halben Jahres eine frappierende, überraschende und hochsignifikante Schmerzhemmung, Besserung der Beweglichkeit und Besserung des Allgemeinbefindens beobachtet werden.  
15 Schwerwiegende Nebenwirkungen traten nicht auf.

#### Beispiel 3: Transformation von mononukleären Blutzellen (PBMC)

##### a) Isolierung und Kultivierung von PBMCs

- Zur Isolierung von PBMCs (mononukleäre Blutzellen) wird eine Dichtegradientenlösung verwendet. Zu diesem Zweck wird nicht coagulierendes Vollblut zu gleichen Teilen mit Kulturmedium oder physiologischer Salzlösung (z.B. Dulbecco's PBS) verdünnt. 50 ml  
20 Zentrifugenröhrchen werden mit 12,5 ml Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) versehen und das verdünnte Vollblut wird vorsichtig über die Trennlösung geschichtet (bis ca. 25 ml pro Röhrchen). Die Röhrchen

werden bei 400 x g für 30 min bei 15 bis 25 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bilden mononukleäre Zellen eine weiße Grenzschicht zwischen der Plasma und der Gradientenlösung. Erythrocyten und Granulocyten befinden sich im Sediment, im Serum befinden sich Thrombocyten.

Vorsichtig werden zuerst Plasma und dann mononukleäre Zellen mit der Pipette entnommen und getrennt in sterile Röhrchen überführt. Die Zellsuspension mit den mononukleären Zellen (PBMCs) wird zu gleichen Teilen mit Kulturmedium oder einer physiologischen Salzlösung (Dulbecco's PBS) gemischt und ungebremst bei 250 x g, 10 min, 25 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird resuspendiert und die Zellen werden 2 bis 3 mal mit Zellkulturmedium RPMI 1640 (mit L-Glutamin) (Invitrogen, Karlsruhe, Best.Nr.: 21875034) gewaschen.

#### b) Elektroporation

Bei der Elektroporation wird eine Zellsuspension in Gegenwart einer DNA-Lösung einem oder mehreren elektrischen Pulsen ausgesetzt. So werden in der Zellmembran Poren erzeugt, durch welche die DNA in die Zelle gelangen kann. Die Bildung der Poren ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig und die Poren müssen nach der Elektroporation wieder geschlossen werden. Dabei sind insbesondere Temperatur und Elektroporationsmedium entscheidend. Nach der Aufnahme der DNA migriert die DNA in den Kern und wird in dem Kern transkribiert. Die Migration in den Kern wird mit Hilfe der Pulse elektrophoretisch unterstützt. Üblicherweise werden unterschiedliche Pulse appliziert. Der erste oder die ersten Pulse sind kurz und stark, das heißt haben eine hohe Feldstärke, die nachfolgenden Pulse sind

gegebenenfalls schwächer und können unterschiedliche Parameter (siehe unten) haben.

Zur Elektroporation von PBMCs werden folgende Bedingungen eingesetzt:

- |    |                         |  |
|----|-------------------------|--|
| 5  | Zellzahl:               | $10^4$ bis $10^{10}$ Zellen pro ml,<br>vorzugsweise $10^7$ Zellen pro ml                           |
|    | DNA-Menge:              | 1 bis 100 µg pro Ansatz,<br>vorzugsweise 20 µg pro Ansatz  |
| 10 | Feldstärke:             | 10 bis 2500 V/cm, d.h. 4 bis 1000V,<br>bei einer 4mm Küvette: vorzugsweise 1500V/cm,<br>d.h. 600 V |
|    | Pulszahl:               | 1 bis 100,<br>vorzugsweise 10  |
| 15 | Pulsdauer:              | 1 bis 1500 µsec,<br>vorzugsweise 0,1 sec   |
|    | Pulsabstand:            | 0,01 bis 1 sec,<br>vorzugsweise 1 sec  |
|    | Kapazität               | 10 bis 4000 µF, vorzugsweise 1050 µF   |
| 20 | Elektroporationsmedium: | RPMI,<br>RPMI+10-30%FCS,<br>RPMI+10-30%AP, PBS,<br>vorzugsweise RPMI+10%AP                         |

c) Einfluss wachstumsstimulierender Faktoren

Die PBMCs werden in mit wachstumsstimulierenden Faktoren versetzten Medien inkubiert. Die Kultivierung erfolgt in RPMI 1640 bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 10% autologem Plasma, zweckmäßigerweise mit  
5 Zugabe von wachstumsstimulierenden Substanzen wie 10-30 U/ml IL-2 (Roche, Mannheim) oder 2-10 µg/ml PHA-M (Roche, Mannheim).

Nach 3 Tagen Inkubation wird elektroporiert. Die Zusammensetzung des Mediums beträgt RPMI + 10% AP + 10 U/ml IL-2. Die Elektroporation erfolgt bei folgenden Bedingungen: 10<sup>7</sup> Zellen pro ml, 20 µg  
10 DNA, 1500 V/cm in 4 mm Küvette, 10 Pulse, 0,1 sec Pulsdauer, 1 sec Pulsabstand und anschließende Inkubation auf Eis für 15 min.

Figur 10 zeigt die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase nach Elektroporation von PBMCs mit *pVaxLacZ*: Es zeigt sich eine deutliche  
15 Erhöhung der spezifischen Aktivität der β-Galaktosidase bei mit DNA elektroporierten Proben im Vergleich den nicht elektroporierten oder ohne DNA elektroporierten Kontrollen.

Beispiel 4: Herstellung einer Glasspritze mit Granulat

Zur Herstellung der Spritze wird die Oberfläche der inneren Struktur  
20 der fabrikneuen und originalverpackten Spritze und des fabrikneuen und originalverpackten Glasgranulats gemäß Beispiel 1 gewaschen und modifiziert: Die Spritze wird dazu durch ein- bis zehnmaliges, vorzugsweise dreimaliges, vollständiges Aufziehen und Ausspritzen der Säure und/oder Lauge behandelt und dabei gesäubert beziehungsweise  
25 modifiziert. Nach dem letzten Aufziehen wird die Spritze

unten abgedichtet und in gefülltem Zustand 5 bis 30 min mit der Säure und/oder Lauge inkubiert. Anschließend wird der Spritzenkolben entfernt und zwei- bis zehnmal, vorzugsweise viermal, durch vollständiges Auffüllen und Ablaufenlassen des Spritzenzylinders mit frischem Reinstwasser durchgewaschen, wobei darauf zu achten ist, dass das Waschwasser vollständig ein- und ausgefüllt wird. Sodann wird der Spritzenkolben in Säure und/oder Lauge getaucht und gründlich mit destilliertem Wasser abgewaschen.

Eventuell in der Spritze vorhandene Wasserreste werden durch Betupfen des Lueranschlusses kapillar abgesaugt, um ein schnelles Trocknen der Spritze zu gewährleisten. Voneinander getrennte Kolben und Spritzen inklusive der eventuell darin enthaltenen Glasperlen werden in Melag-Folie mit Indikatorfeld (Melag, Melafol 1502) eingeschweißt (Melag, Melaseal). Die so verpackten Spritzen werden im Trockenschrank (Melag-Trockensterilisator) bei 80°C für mindestens 60 min getrocknet. Die getrockneten verpackten Spritzen werden anschließend bei 132°C 30 min bei 2 bar autoklaviert (Wolf Autoklav HRM 242 II) und bei 80°C für mindestens 60 min ein weiteres Mal getrocknet.

Das Granulat wird mehrmals mit Salzlösung/Puffer gewaschen und für mindestens 2 Std. in der Plasmid-Salzlösung inkubiert. Dieses Plasmid enthält mindestens eine Sequenz, die für ein Protein und/oder Effektormolekül codiert, sowie mindestens ein regulatorisches Element wie einen Promotor, welches in eukaryotischen Zellen wirksam ist, beispielsweise das *pcDNA1-IL-1Ra*. Entscheidend für eine hohe Protein- und/oder Effektorproduktion ist die Pyrogenfreiheit der verwendeten DNA. Die beschichteten Kugeln, bzw.



Granulat, werden nach der Inkubation gewaschen und mit Ethanol oder Gas in an sich bekannter Weise, vorzugsweise wie in Beispiel 1 dargestellt, sterilisiert.

- 5 Vor der Anwendung der Glasspritze wird Heparin (z.B. Liquemin™ N 2500, Heparin-Natrium™ 2500 I.E.) oder Citrat (z.B. ACDA) in die Spritze eingebracht, um eine Koagulation des später aufgenommenen Blutes zu verhindern. Der Einsatz von Coagulantien erweist sich auch vorteilhaft bei der Aufarbeitung von IL-1Ra-haltigem Serum.

### Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer induzierten Blutzusammensetzung aus Blut, wobei im Blut enthaltende Blutzellen transient oder stabil mit mindestens einem Nucleinsäuremolekül transformiert werden, vorzugsweise mit einem Nucleinsäuremolekül, welches mindestens ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein oder ein Effektormolekül codiert und eine induzierte Blutzusammensetzung erhalten wird, deren Blutzellen transient oder stabil das therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Protein und/oder das Effektormolekül exprimieren und gegebenenfalls sezernieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die induzierte Blutzusammensetzung eine Blutzusammensetzung ist, die mindestens ein therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsames Protein in höherer Konzentration als eine nicht transformierte Blutzusammensetzung enthält, zum Beispiel Cytokine, wie natürliches oder abgewandeltes IL-1Ra (IRAP; Interleukin 1 Rezeptorantagonist).
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die induzierte Blutzusammensetzung eine Blutzusammensetzung ist, in deren Blutzellen mindestens ein Effektormolekül, vorzugsweise Protein oder RNA, exprimiert wird, welches in nicht transformierten Blutzellen gar nicht oder nicht in dieser Menge exprimiert wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Blut einem Patienten mit einem Entnahmesystem entnommen und das Blut mit dem mindestens einen Nucleinsäuremolekül in dem

Entnahmesystem transformiert wird, ohne vorher die zu transformierenden Blutzellen von anderen Blutkomponenten abzutrennen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Blut einem Patienten entnommen, Blutzellen, insbesondere nucleäre Zellen, von anderen Blutkomponenten getrennt, die Blutzellen transformiert und in Medium mit oder ohne Serum oder in reinem Serum inkubiert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Blut einem Patienten mit einem Entnahmesystem entnommen, in ein anderes Gefäß gefüllt und in diesem Gefäß transformiert wird, ohne vorher die zu transformierenden Blutzellen von anderen Blutkomponenten abzutrennen.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, immobilisiert auf festen Trägern, zum Beispiel großen oder kleinen Kugeln, beispielsweise aus Glas, oder magnetischen Kügelchen oder der Wand der Spritze, zur Transformation verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül, insbesondere DNA oder RNA, gegebenenfalls markiert mit einer Markersubstanz, zur Transformation verwendet wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül, insbesondere die DNA oder RNA, zusammen mit einem Zusatz, der die Transfektion und/oder Expression des Nucleinsäuremoleküls erhöht, transformiert wird.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül durch Elektroporation transformiert wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül ein die Expression körpereigener Proteine induzierendes, reprimierendes oder regulierendes Molekül codiert, zum Beispiel ein Antisensekonstrukt, RNA-Element, Transkriptionsfaktor oder ein transposables Element.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül in einem Vektor enthalten ist, zum Beispiel in einem Plasmid oder in einem Virus.
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül funktionell verbunden zu mindestens einem regulatorischen Element, zum Beispiel einem Promotor, Enhancer oder Intron, vorliegt, insbesondere einem blutzellspezifischen regulatorischen Element.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Nucleinsäuremolekül funktionell verbunden zu einem ein Signalpeptid für die Proteinsezernierung aus der Zelle codierenden Nucleotidabschnitt vorliegt.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei nach der Transformation, Expression und Sezernierung des mindestens einen induzierten therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen Proteins aus den transformierten Zellen in das Serum die Zellen vom Serum abgetrennt werden und ein induziertes Serum erhalten wird.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das mindestens eine Nucleinsäuremolekül mit Hilfe von Liposomen, viralen Vektoren oder gebunden an Mikroglaskügelchen transformiert wird.

5 17. Verfahren zur Transformation von Zellen, insbesondere im Blut vorhandenen Zellen, zum Beispiel Blutzellen, mit Nucleinsäuremolekülen, wobei die Zellen oder Blutzellen mit den Nucleinsäuremolekülen in Kontakt gebracht, die Zellen oder die im Blut vorhandenen Blutzellen transformiert und stabil oder transient transformierte Zellen oder Blutzellen erhalten werden.

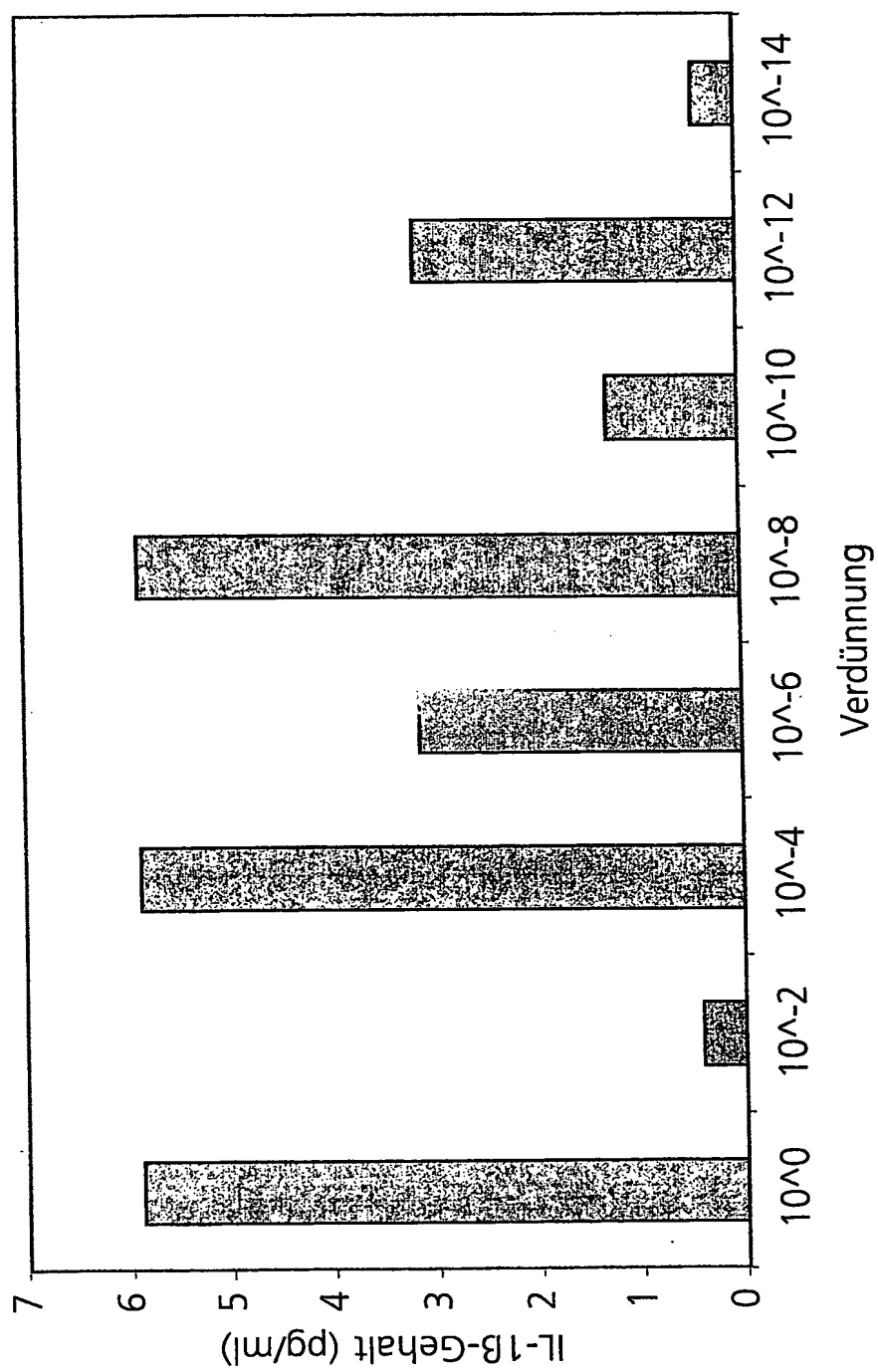
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Nucleinsäuremoleküle vor der Transformation insbesondere kovalent, insbesondere säurelabil an Mikroglaskügelchen gebunden werden.

15 19. Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, wobei dem menschlichen oder tierischen Körper Blut, vorzugsweise mittels einer Spritze, entnommen, ein Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche durchgeführt und die induzierte Blutzusammensetzung dem menschlichen oder tierischen Körper wieder reappliziert wird, gegebenenfalls allein das Blutserum nach Abtrennung von den transformierten Blutzellen und anderen Blutkomponenten.

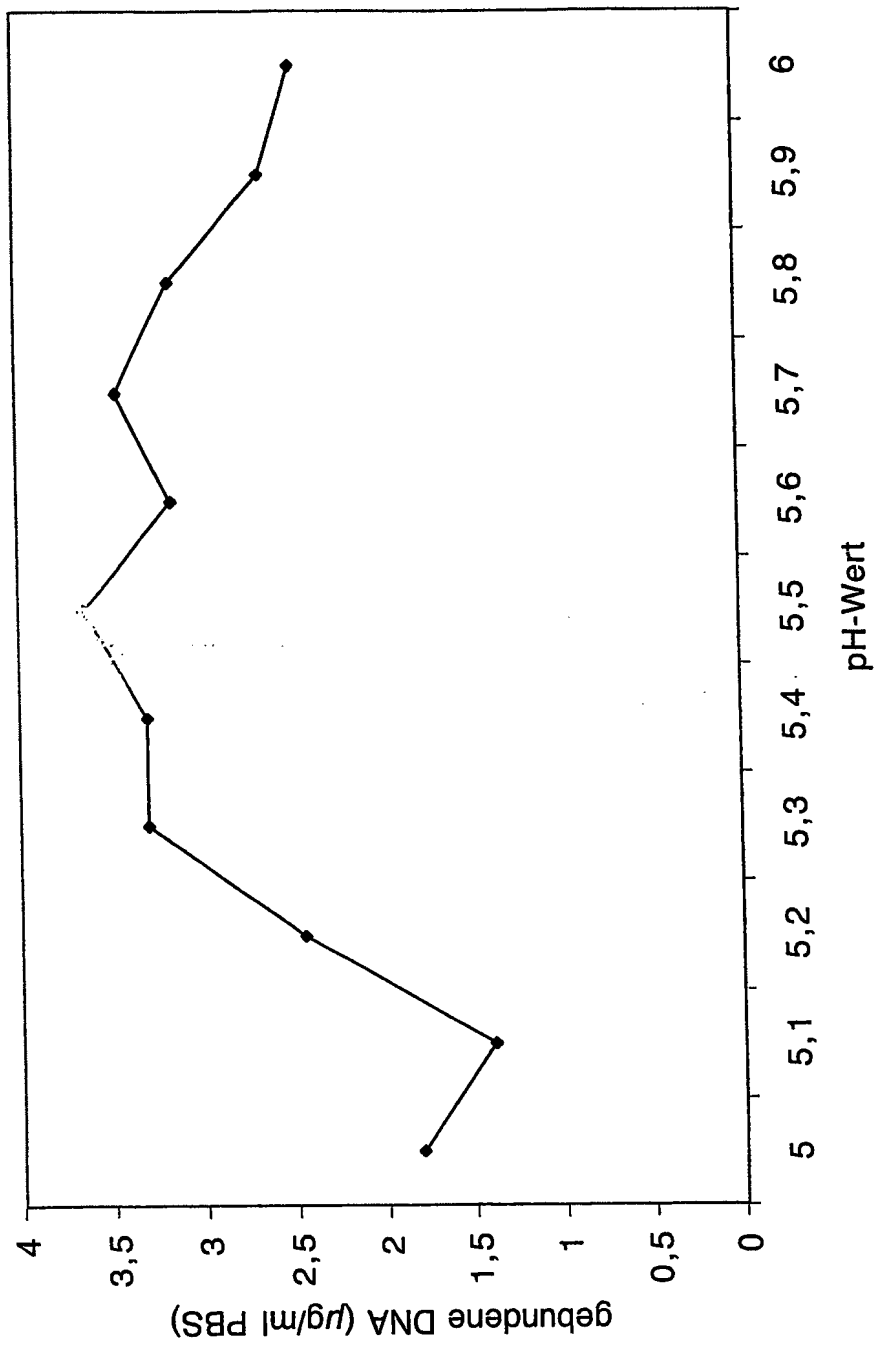
20. Verwendung von Mikroglaskügelchen, insbesondere gebundene Nucleinsäuren aufweisende Mikroglaskügelchen, für die Transformation von Vollblut, insbesondere nucleären Zellen im Vollblut, insbesondere für die Expression und Sezernierung von Proteinen in Blut, insbesondere Blutzellen.

21. Verwendung von Mikrogaskügelchen, insbesondere gebundene Nucleinsäuren aufweisende Mikrogaskügelchen, für die Transformation von biologischen Zellen, insbesondere tierischen, pflanzlichen oder humanen Zellen.
- 5 22. Verwendung von Blut, insbesondere Vollblut, für die Transformation von Nucleinsäuremolekülen, codierend therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine oder Effektormoleküle, in die Blutzellen des Blutes, insbesondere für die Gentherapie und/oder die Behandlung von Leukämie, für die Behandlung von traumatischen, degenerativen, chronisch inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems, des Bewegungsapparates oder verschiedener innerer Organe.
- 10 23. Verwendung von Blut für die Herstellung eines Arzneimittelkits für gentherapeutische Zwecke und/oder die Behandlung von Leukämie, für die Behandlung von traumatischen, degenerativen, chronisch inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems, des Bewegungsapparates oder verschiedener innerer Organe.
- 15 24. Verwendung von Nucleotidmolekülen, insbesondere codierend für therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine oder Effektormoleküle, für die Transformation von Blut oder Blutzellen und die Expression und gegebenenfalls Sezernierung des therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen Proteins beziehungsweise Effektormoleküls, zum Beispiel für die Leukämiebehandlung, für die Behandlung von traumatischen, degenerativen, chronisch inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems, des Bewegungsapparates oder verschiedener innerer Organe.
- 20 25

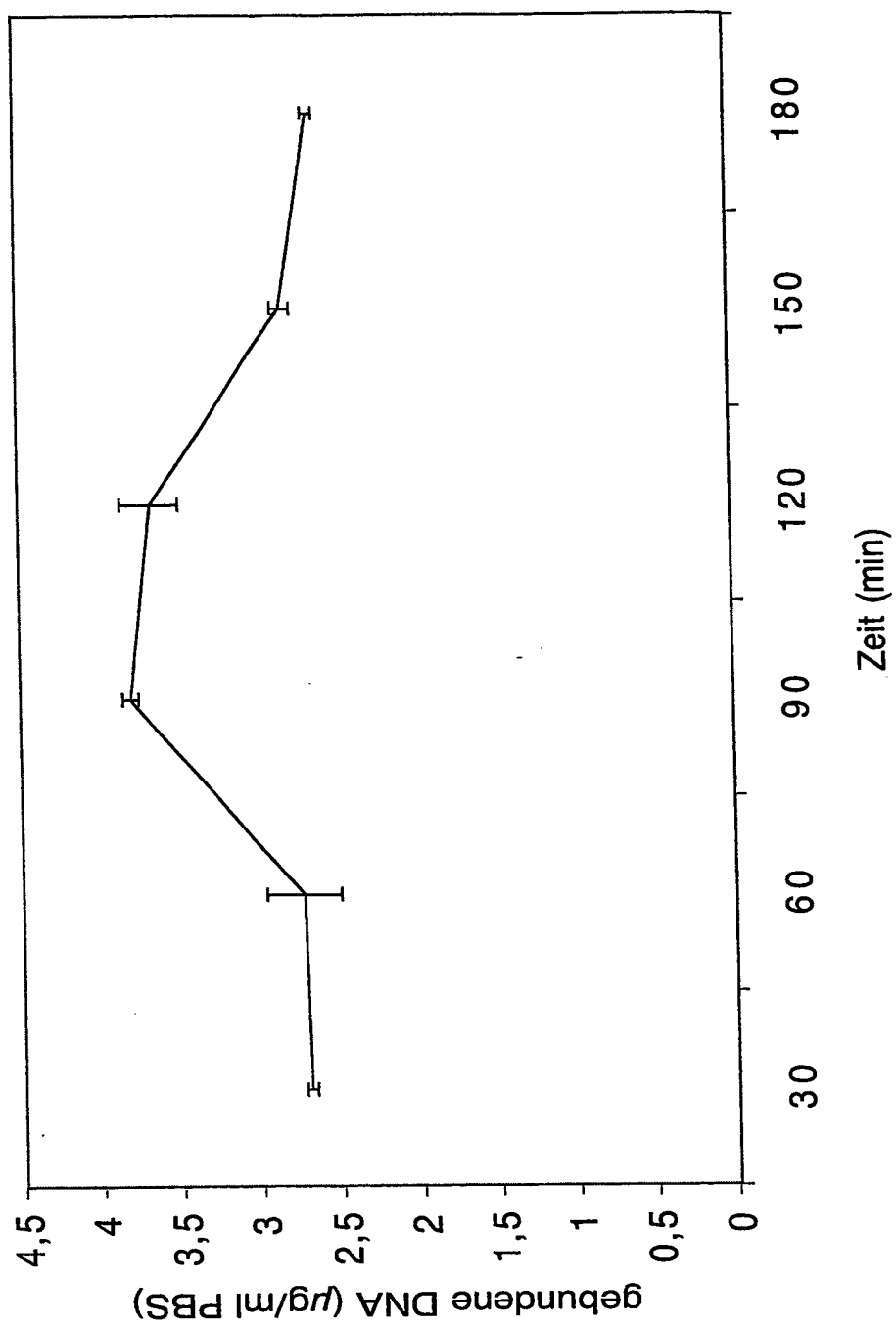
25. Verwendung von Nucleotidmolekülen, insbesondere codierend für therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsame Proteine oder Effektormoleküle, für die Herstellung eines Arzneimittelkits, für die Transformation von Blut oder Blutzellen und die Expression und gegebenenfalls Sezernierung des therapeutisch und/oder diagnostisch bedeutsamen Proteins beziehungsweise Effektormoleküls, zum Beispiel für die Behandlung von traumatischen, degenerativen, chronisch inflammatorischen Erkrankungen des Nervensystems, des Bewegungsapparates oder verschiedener innerer Organe.
- 5

**Figur 1**

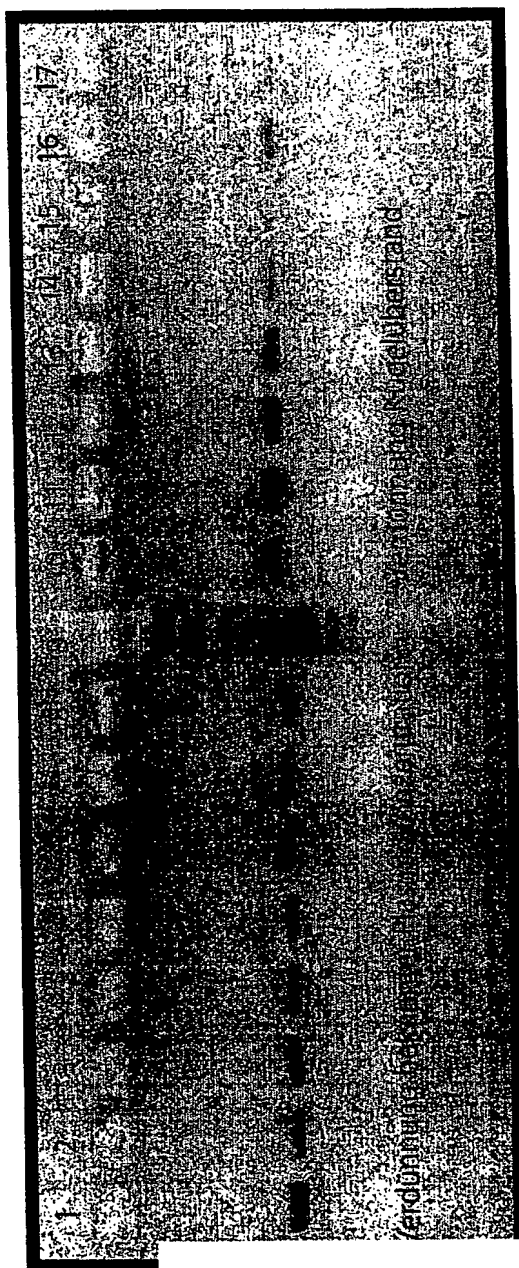




Figur 2

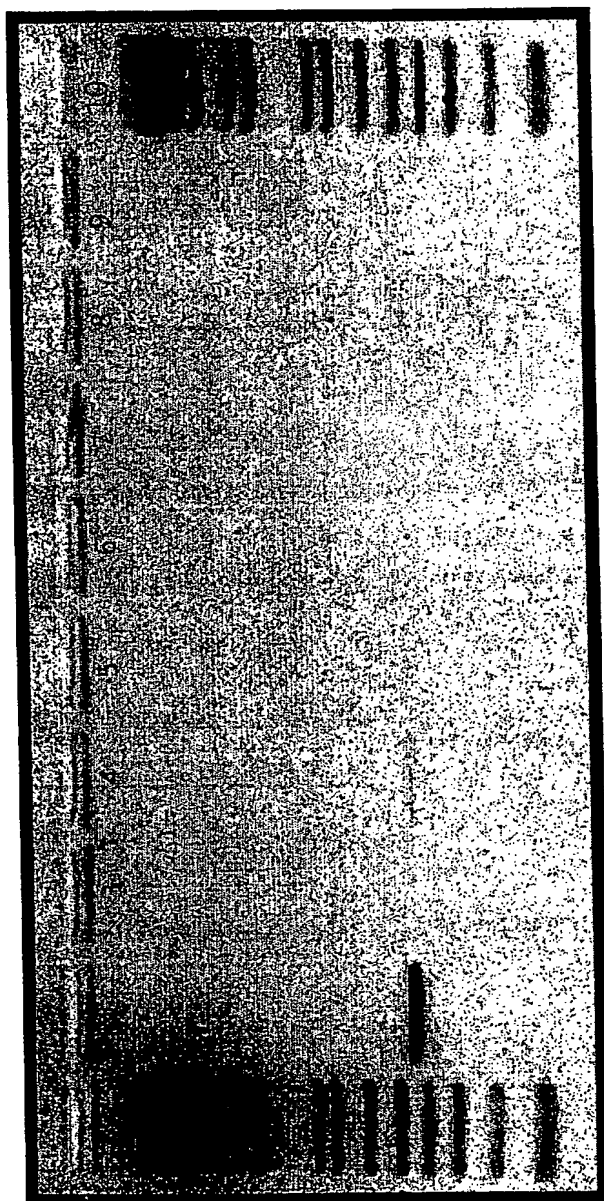
**Figur 3**

1: 1 µg/ml  
2: 100 ng/ml  
3: 10 ng/ml  
4: 1 ng/ml  
5: 100 pg/ml  
6: 10 pg/ml  
7: 1 pg/ml  
8: 100 fg/ml  
9: Ladder  
10: 10<sup>0</sup>  
11: 10<sup>-1</sup>  
12: 10<sup>-2</sup>  
13: 10<sup>-3</sup>  
14: 10<sup>-4</sup>  
15: 10<sup>-5</sup>  
16: 10<sup>-6</sup>  
17: 10<sup>-7</sup>

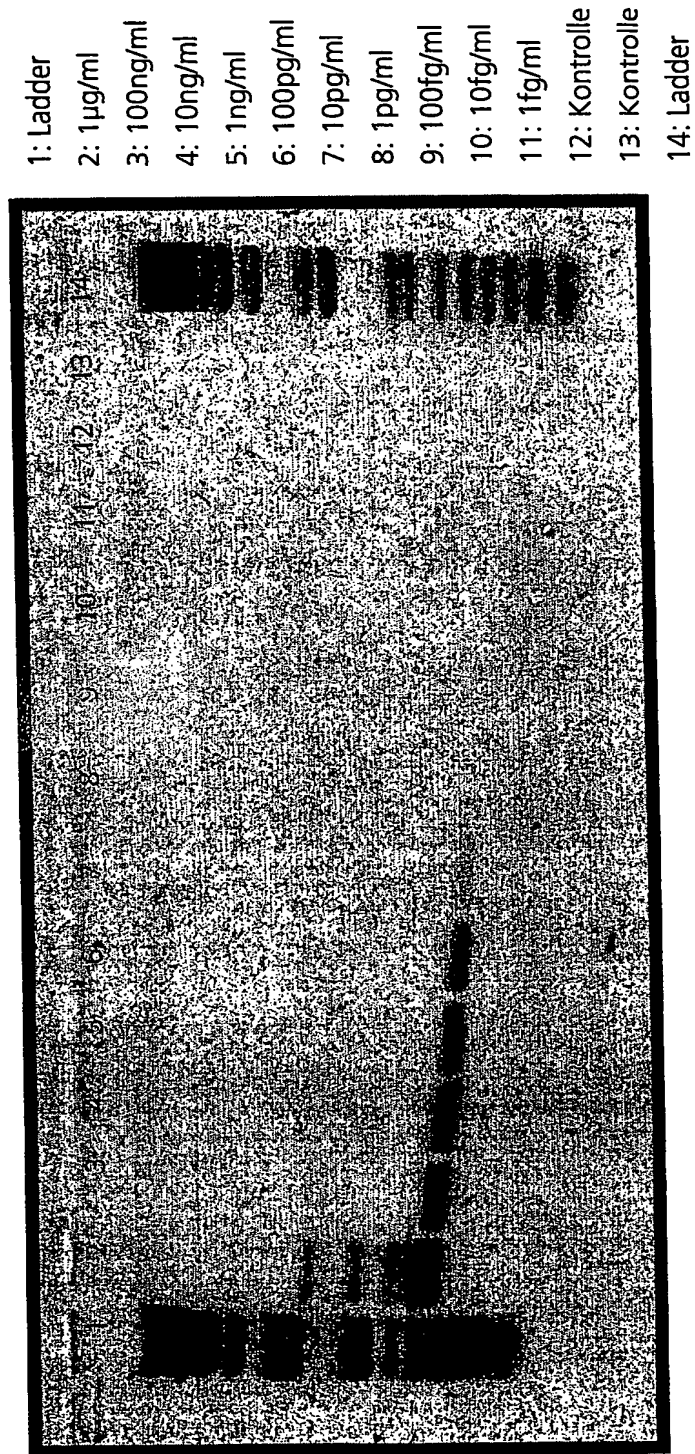


Figur 4

1: Ladder  
2: 1µg/ml  
3: 100ng/ml  
4: 10ng/ml  
5: 1ng/ml  
6: 100pg/ml  
7: 10pg/ml  
8: 1pg/ml  
9: Kontrolle  
10: Ladder

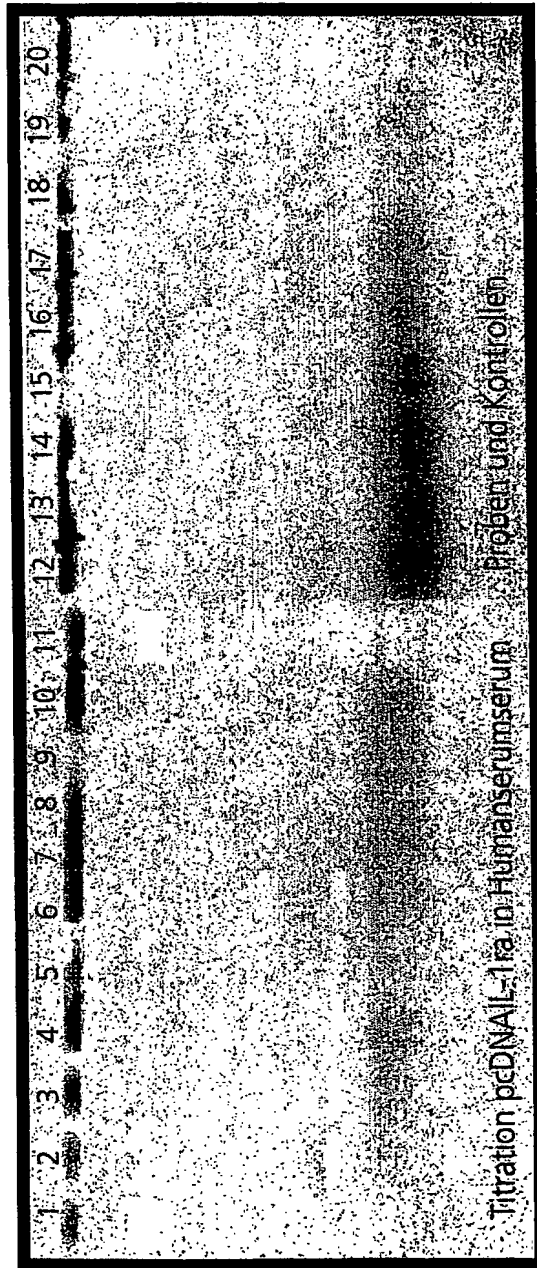


Figur 5



Figur 6

- 1: Ladder
- 2: 100 ng/ml
- 3: 10 ng/ml
- 4: 1 ng/ml
- 5: 100 pg/ml
- 6: 10 pg/ml
- 7: 1 pg/ml
- 8: 100 fg/ml
- 9: 10 fg/ml
- 10: 1 fg/ml
- 11: Ladder
- 12: Wasser
- 13: Wasser
- 14: Prototyp
- 15: Prototyp
- 16: Prototyp
- 17: Orthokin
- 18: Orthokin
- 19: Orthokin
- 20: Ladder



Figur 7

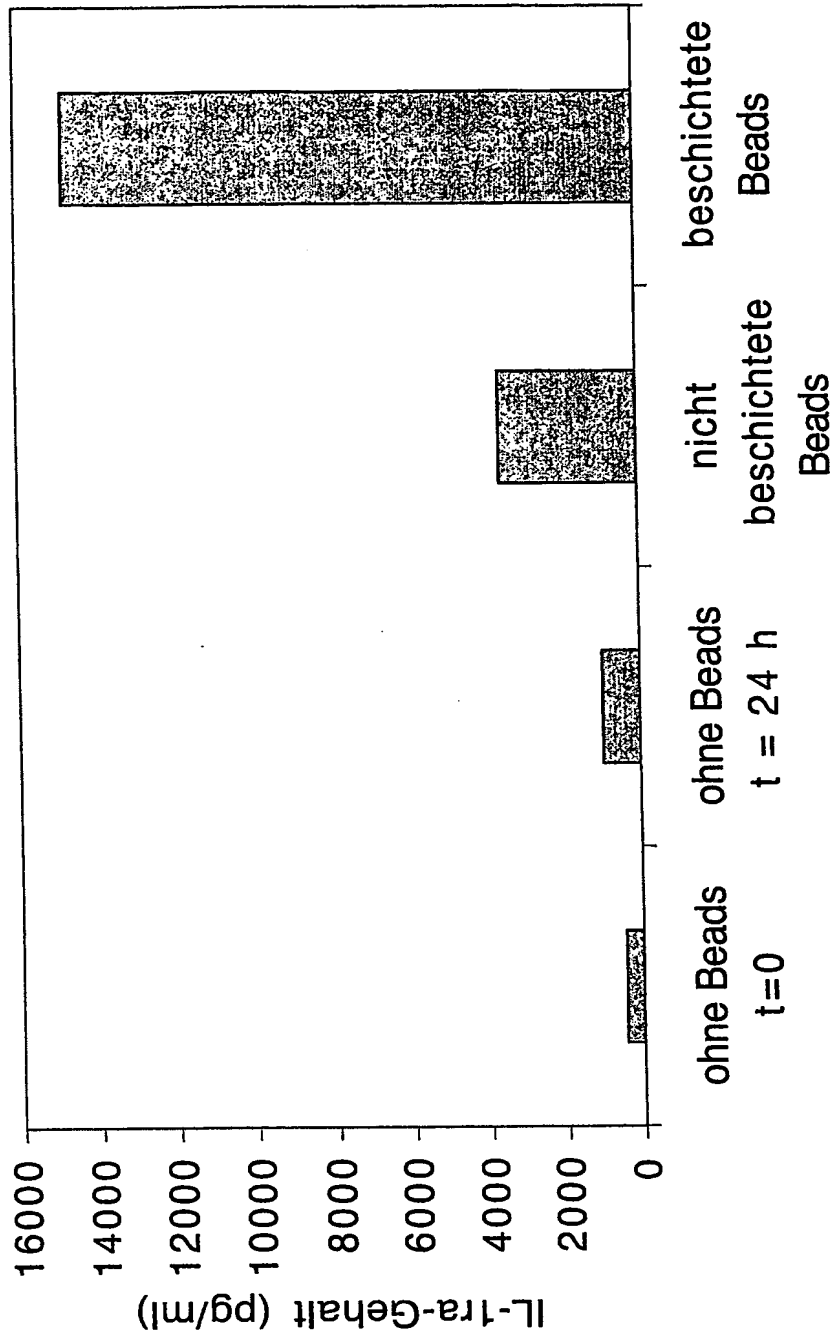
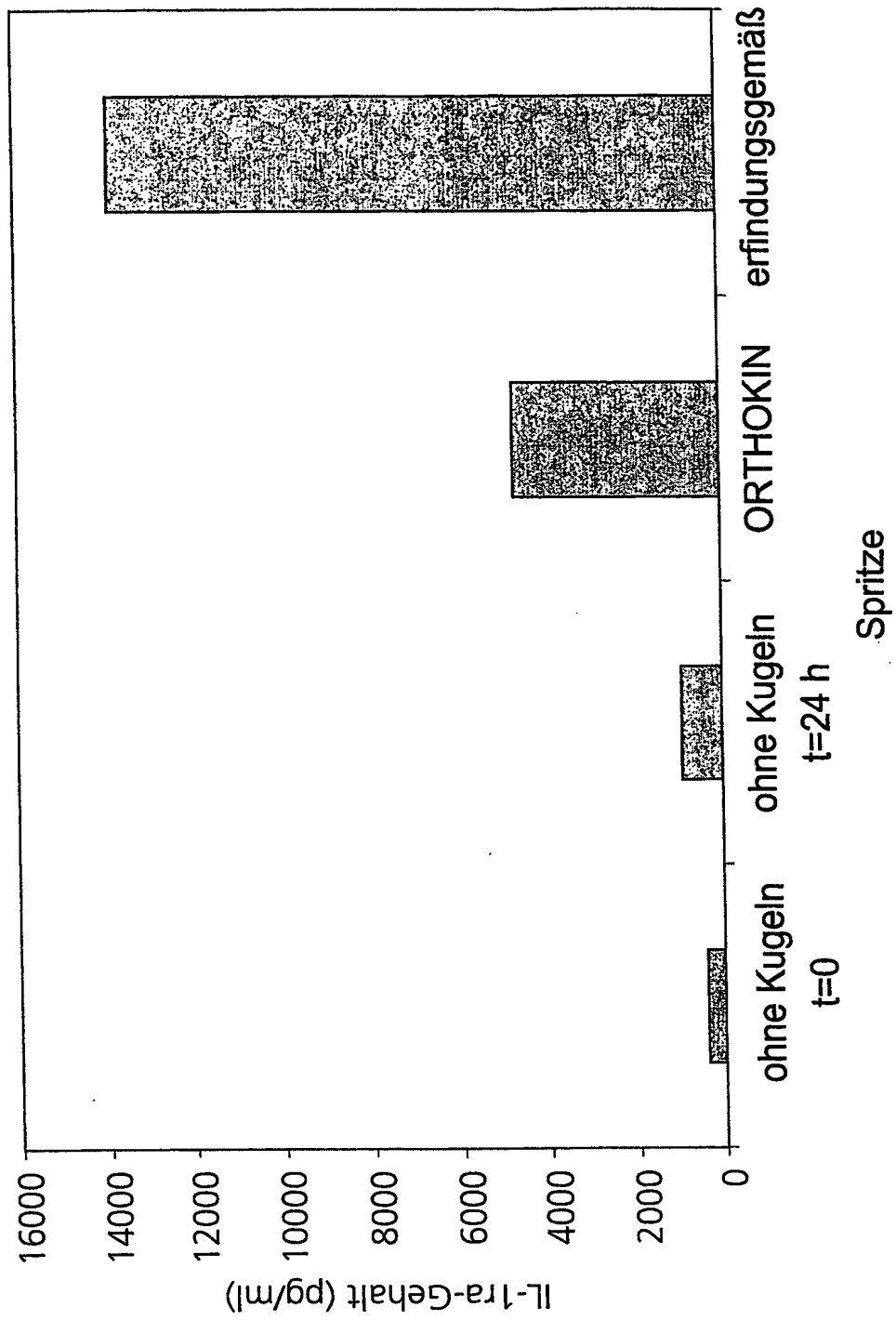
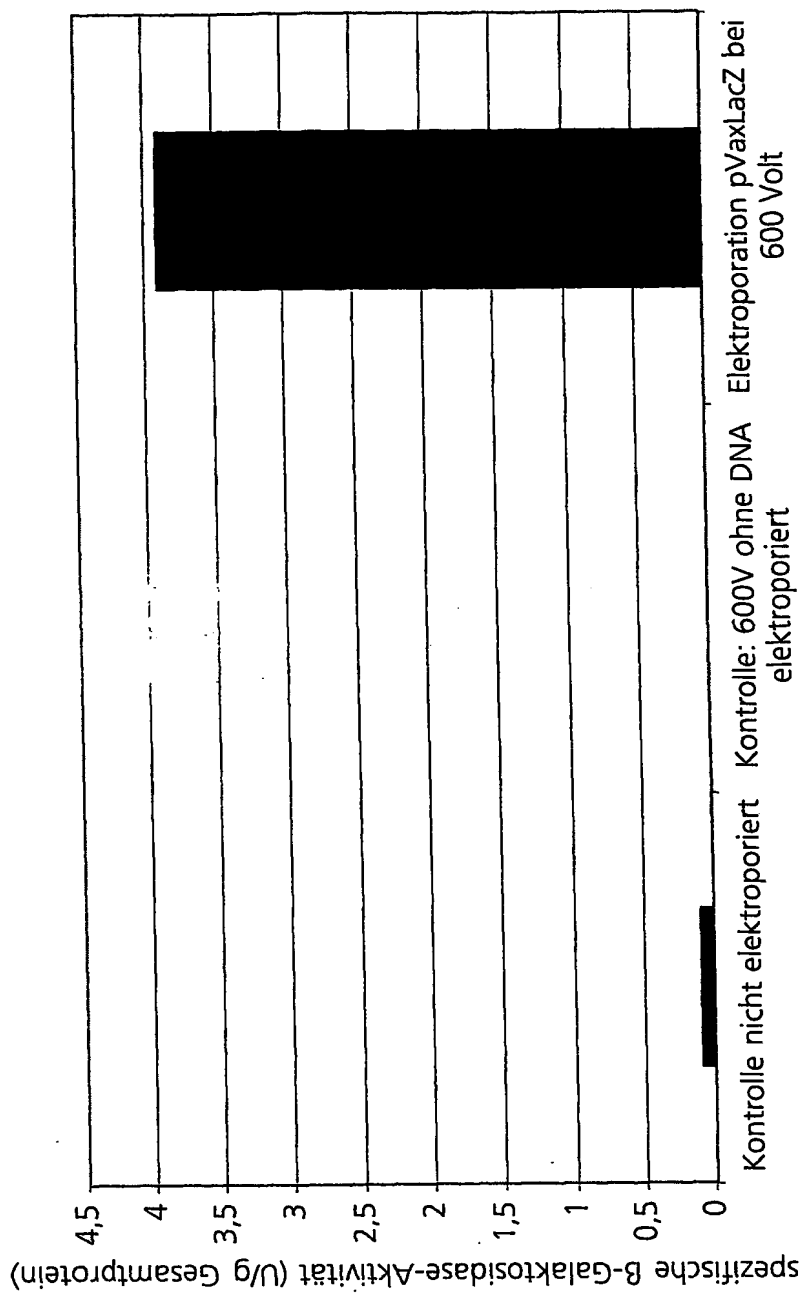
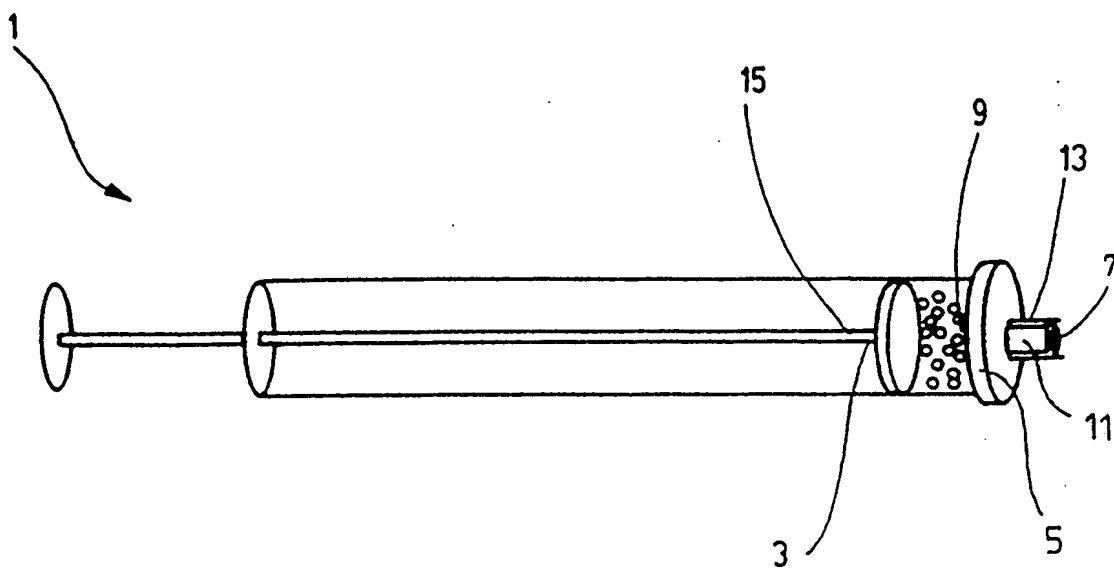


Figure 8

**Figur 9**



**Figur 10**

**Figur 11**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 03/02969

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 399 346 A (ANDERSON W FRENCH ET AL) 21 March 1995 (1995-03-21)	1-3,5, 17,19
Y	column 14, last paragraph -column 15, line 36; claims 1-4	7-16,18, 20-25
X	US 2002/034495 A1 (ANDERSON W FRENCH ET AL) 21 March 2002 (2002-03-21)	1-3,5, 17,19
Y	column 1, paragraph 6; claims 1-4; example 3	7-16,18, 20-25
X	WO 01 75131 A (UNIV TECHNOLOGY CORP) 11 October 2001 (2001-10-11)	7,16,20, 21
	page 40, line 10-15	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2003

Date of mailing of the international search report

04/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ludwig, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/02969

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5399346	A	21-03-1995	US 2002034495 A1	21-03-2002
US 2002034495	A1	21-03-2002	US 5399346 A	21-03-1995
			US 5228362 A	20-07-1993
WO 0175131	A	11-10-2001	AU 5113201 A	15-10-2001
			WO 0175131 A2	11-10-2001

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 399 346 A (ANDERSON W FRENCH ET AL) 21. März 1995 (1995-03-21)	1-3,5, 17,19
Y	Spalte 14, letzter Absatz -Spalte 15, Zeile 36; Ansprüche 1-4	7-16,18, 20-25
X	US 2002/034495 A1 (ANDERSON W FRENCH ET AL) 21. März 2002 (2002-03-21)	1-3,5, 17,19
Y	Spalte 1, Absatz 3; Ansprüche 1-4; Beispiel 3	7-16,18, 20-25
X	WO 01 75131 A (UNIV TECHNOLOGY CORP) 11. Oktober 2001 (2001-10-11) Seite 40, Zeile 10-15	7,16,20, 21

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*g\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Juni 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/07/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Ludwig, G

# INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

International Patent Symbol

PCT/EP 03/02969

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5399346	A	21-03-1995	US	2002034495 A1	21-03-2002
US 2002034495	A1	21-03-2002	US	5399346 A	21-03-1995
			US	5228362 A	20-07-1993
WO 0175131	A	11-10-2001	AU	5113201 A	15-10-2001
			WO	0175131 A2	11-10-2001

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**